Aus dem Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie
der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. phil. Wolrad Vogell

PRIMÄRPROZESSE DER RETENTION UND INFILTRATION VON NEURAMINIDASE-BEHANDELTEN LYMPHOZYTEN IN MÄUSELEBERN

Elektronenmikroskopische Studie der Zell-Kontakte von desialylierten Lymphozyten aus Milz und Thymus mit den Zellen der Leber

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Bernhard Birmes

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0048

Aus dem Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie
der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. phil. Wolrad Vogell

PRIMÄRPROZESSE DER RETENTION UND INFILTRATION VON NEURAMINIDASE-BEHANDELTEN LYMPHOZYTEN IN MÄUSELEBERN

Elektronenmikroskopische Studie der Zell-Kontakte von desialylierten Lymphozyten aus Milz und Thymus mit den Zellen der Leber

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Bernhard Birmes

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. Vogell
Korreferent
gez.: Prof. Dr. Frenzel

MEINEN ELTERN GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG 1

2. EINFÜHRUNG 3

3. MATERIALIEN UND METHODEN 7

3.1. Versuchstiere 7
3.2. Materialien 7
3.3. Methoden 10
3.3.1. Versuchsdurchführung 10
3.3.2. Präparation der Leber 11
3.3.3. Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie 12
3.3.3.1. Einbettung 12
3.3.3.2. Herstellung der Schnittpräparate 13
3.3.4. Elektronenmikroskopische Auswertung 13
3.3.5. Identifikation der Lymphozyten 14
3.3.6. Identifikation der Zelltypen der Leber 15

4. ERGEBNISSE 17

4.1. Semiquantitative Auswertung der Zahl adhärenter Lymphozyten in der Leber 18
4.2. Morphologie der Kontakte zwischen Lymphozyten und den Zellen der Leber 19
4.2.1. Kontakte zwischen Lymphozyten und Sinusoidalzellen 19
4.2.2. Kontakte zwischen Lymphozyten und Parenchymzellen 21
4.3. Anzeichen der beginnenden Infiltration adhärenter Lymphozyten in die Leber 22
4.3.1. Invaginationsstrukturen an Endothelzellen 24
4.3.2. Lymphozyten, deren Mikrovilli durch das Endothel in den Disseschen Raum ragen 25
4.3.3. Invaginationsstrukturen an Hepatozyten 26

5. DISKUSSION 29

5.1. Mechanismen, die zu einer Retention desialylierter Lymphozyten in der Leber führen können 30

5.2. Mechanismen, die zu einer Infiltration adhärenter Lymphozyten in die Leber führen können 39

6. TABELLEN/DIAGRAMME 49

7. ABBILDUNGEN 53

8. LITERATUR 73

1. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden die frühen Stadien der Retention und Infiltration von Neuraminidase-behandelten Lymphozyten in Mäuse-Lebern untersucht. Diese Lymphozyten exponieren in ihrer Glykokalix nach Abspaltung der terminalen Sialinsäure D-Galaktosyl-Reste. In der Plasmamembran von Hepatozyten (Ashwell und Morell, 1974) und Kupfferzellen (Kolb-Bachofen et al., 1982) ist ein Galaktose-spezifischer Rezeptor lokalisiert, der desialylierte Lymphozyten bindet (Novogrodsky und Ashwell, 1977; Kolb et al., 1979). Die Retention führt zu einer autoimmunen, organspezifischen Infiltration, bei der nicht die Zielzellen des Organs, sondern die infiltrierenden Lymphozyten verändert sind (Kolb-Bachofen und Kolb, 1979).

Ziel der Arbeit war, Aufschluß darüber zu erhalten, welche Zelltypen der Leber in vivo desialylierte Lymphozyten binden und für deren Retention verantwortlich sind. Außerdem sollten erstmals die frühesten Stadien der autoimmunen, lymphozytären Infiltration untersucht werden.

Dazu wurden Lymphozyten aus Milz und Thymus von BALB/c-Mäusen nach Inkubation mit Neuraminidase (E.C. 3.2.1.18) intravenös in syngene Rezipienten injiziert. Eine Stunde und drei Stunden nach der Injektion wurde die Leber der Versuchstiere entnommen und für die Elektronenmikroskopie aufbereitet. Die in den Schnittpräparaten nachweisbaren Lymphozyten wurden morphologisch und semiquantitativ auf ihre Zellkontakte sowie Zeichen der beginnenden Infiltration untersucht. Als Kontrolle dienten scheinbehandelte Lymphozyten.

Es zeigte sich, daß die Injektion der desialylierten Lymphozyten zur Retention von morphologisch intakten Lymphozyten in der Leber führt. Die Retention erfolgt über Kontakte zu drei Zelltypen: Kupfferzellen und Endothelzellen sowie zu einem geringen Teil Hepatozyten, deren Mikrovilli durch die endothelialen Fenestrae ins Lumen der Sinusoide ragen können. Bereits eine Stunde nach Injektion finden sich Lymphozyten, deren Mikrovilli Invaginationsstrukturen an Endothelzellen ausgebildet haben oder durch das Endothel in Invaginationen von Hepatozyten ragen. Diese Stukturen werden als Zeichen der beginnenden Infiltration interpretiert.

3 Stunden nach Injektion hat ein Teil der Lymphozyten die Leber wieder verlassen, während die Infiltrationsanzeichen sich qualitativ und quantitativ verstärken. Kupfferzellen werden von den Lymphozyten nicht angegriffen. Umgekehrt werden desialylierte Lymphozyten im Gegensatz zu desialylierten Erythrozyten von Kupfferzellen nicht phagozytiert. Infiltrierende Lymphozyten haben in überdurchschnittlicher Anzahl Kontakte zu Kupfferzellen. Die Ausdehnung dieser Kontakte nimmt im Beobachtungszeitraum zu.

Wir nehmen an, daß eine Subpopulation der desialylierten Lymphozyten überwiegend durch den Kontakt zu Kupfferzellen zur zytotoxischen Aktivität stimuliert wird und die Leber zu infiltrieren beginnt. Die Bedeutung des Galaktose-spezifischen Rezeptors auf Kupfferzellen und Hepatozyten bei Retention und Stimulation zur zytotoxischen Aktivität wird diskutiert.

2. EINFÜHRUNG

Lymphozyten zeigen im Säugetierorganismus ein charakteristisches Zirkulationsmuster (Gowans und Knight, 1964): Sie verlassen selektiv die peripheren Blutgefäße und gelangen über die Lymphdrainage der Gewebe in die regionalen Lymphknoten. Hier werden sie zurückgehalten und nach gewisser Zeit in die Lymphgefäße entlassen. Über den Ductus thoracicus gelangen sie wieder in das zirkulierende Blut - der Kreislauf beginnt von neuem und bietet einer möglichst großen Anzahl von Lymphozyten die Gelegenheit, im gesamten Organismus Kontakt zu Antigenen zu erhalten.

Radioaktiv markierte, intravenös injizierte, syngene Lymphozyten folgen dieser Route und sammeln sich zunächst zum großen Teil in den Lymphknoten (sogen. Rezirkulation oder "homing") (Gowans, 1959).

Die Behandlung der Lymphozyten mit bestimmten Enzymen vor der Reinjektion ändert ihr Zirkulationsmuster in charakteristischer Weise. Trypsinbehandelte Lymphozyten werden zunächst überwiegend in der Milz zurückgehalten (Woodruff und Gesner, 1968). Glykosidase-behandelte Lymphozyten akkumulieren dagegen in der Leber (Gesner und Ginsburg, 1964). Diese Beobachtungen legen nahe, daß die Route der Lymphozyten im Organismus durch ihre Oberflächenstrukturen bestimmt wird.

Eingehender ist in den letzten Jahren das Verhalten der Lymphozyten nach Inkubation mit Neuraminidase und anschließender Injektion in syngene Rezipienten untersucht worden: Diese Lymphozyten werden zunächst in der Leber zurückgehalten. Eine große Subpopulation verläßt die Leber innerhalb von zwei Tagen wieder und rezirkuliert zu den Lymphknoten (Woodruff und Gesner, 1969). Die Vorinkubation der Lymphozyten mit

Newcastle Disease-Viren (Woodruff und Woodruff, 1974) oder Influenza-Viren (Woodruff und Woodruff, 1976), die beide Neuraminidase-Aktivität besitzen, hat ähnliche Auswirkungen.

Da die genannten Untersuchungen auf der Radioisotop-Markierung der Lymphozyten beruhen und eine ultrastrukturelle Studie bislang fehlt, sind die morphologischen Aspekte der Retention unbekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher mit Hilfe der Elektronenmikroskopie abgeklärt werden, welche Zelltypen der Leber in vivo durch Kontakte zu den desialylierten Lymphozyten deren Retention verursachen.

Anhand der Studien mit radioaktiv markierten, desialylierten Lymphozyten ist zu schließen, daß eine kleine Subpopulation in der Leber verbleibt (Woodruff und Woodruff, 1976). 7 Tage nach Injektion der desialylierten Lymphozyten zeigt sich, daß diese Subpopulation das Leberparenchym infiltriert und Nekrosen an Zellen der Leber verursacht (Kolb-Bachofen und Kolb, 1979). Diese Infiltration ist als organspezifische Autoimmunerkrankung anzusehen, da sich die zytotoxische Aktivität gegen syngene Strukturen richtet. Es sind jedoch in diesem Modell nicht die Zielzellen des Organs, sondern die infiltrierenden Lymphozyten verändert.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob zu frühen Zeiten (1 und 3 Stunden) nach Injektion bereits Anzeichen einer Infiltration vorhanden sind. Die initialen Stadien dieser Infiltration sollten beschrieben werden und mit anderen in vitro- und in vivo-Modellen lymphozytotoxischer Aktivität verglichen werden.

Der molekulare Mechanismus der Retention ist bislang noch kontrovers. Durch die Neuraminidase-Behandlung werden in der Glykokalix der Lympho-

zyten terminale Sialinsäure-Reste abgespalten und subterminale D-Galaktosyl-Reste exponiert (Kornfeld und Kornfeld, 1980).

In der Plasmamembran von Hepatozyten ist ein Galaktose-spezifischer Rezeptor lokalisiert, das sogen. hepatic binding protein (HBP) (Ashwell und Morell, 1974). Kolb et al. (1980) wiesen einen Rezeptor mit identischer Spezifität auch auf Kupfferzellen nach. Ober diese Rezeptoren binden desialylierte Lymphozyten in vitro an Hepatozyten (Novogrodsky und Ashwell, 1977) und an Kupfferzellen (Kolb et al., 1979). Durch Bindung an das HBP werden Asialo-Lymphozyten zur zytotoxischen Aktivität stimuliert (Vierling et al., 1978). Kürzlich konnte die in vivo-Bindung von elektronendicht markierten, desialylierten Glykoproteinen sowohl an Kupfferzellen und Hepatozyten als auch an Endothelzellen nachgewiesen werden (Kolb-Bachofen, 1981; Kolb-Bachofen et al., 1982; Kolb-Bachofen et al., 1983). Es ist demnach möglich, daß Retention und Stimulation zur Infiltration auch in vivo auf der Bindung an die Galaktose-spezifischen Rezeptoren beruhen, obwohl auch andere Mechanismen, wie z.B. der F_c-Rezeptor auf Kupfferzellen, diskutiert werden (Steer et al., 1980).

Zum Ausschluß einer Bindung über auf der Oberfläche der Lymphozyten haftende Neuraminidase werden die Versuche auch mit Lymphozyten aus dem Thymus durchgeführt. 80 - 95 % dieser Lymphozyten exponieren in situ Galaktosyl-Reste (Reisner et al., 1976; Raedler et al., 1981). Scheinbehandelte Thymozyten dürften jedoch im Falle einer Erkennung der Neuraminidase nicht in der Leber zurückgehalten werden.

In der vorliegenden Arbeit werden die hier gewonnenen morphologischen Ergebnisse im Zusammenhang mit möglichen Mechanismen diskutiert. Abschließend werden Bezüge zu klinischen Krankheitsbildern hergestellt.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. Versuchstiere

BALB/c-Mäuse von Bomholtgård, Ry, Dänemark.
Es wurden weibliche Tiere im Alter von 8 bis 20 Wochen verwandt.
Die Wahl eines Inzuchtstammes sollte die Verwicklung allogener Strukturen in Retention und Infiltration ausschließen.

3.2. Materialien

Markierung der Kupfferzellen

Latex-Lösung (Sigma, München)
mittlerer Partikeldurchmesser 0,81 µm, 1 : 3
verdünnt mit 0,9 %iger NaCl-Lösung

Isolierung und Behandlung der Lymphozyten

Eagle's Medium (Flow Laboratories, Meckenheim)
Vibrio cholerae Neuraminidase (Behringwerke, Marburg),
E.C. 3.2.1.18, Enzymaktivität 10^{-5} U/µl

Ermittlung der Zellzahl

0,05 %ige Kristallviolett-Lösung, versetzt mit 0,1 M/l Zitronensäure

Vitalitätstest

Trypanblau (Gibco Bio-Cult, Karlsruhe)
0,1 %ige Lösung in 0,9 % NaCl

Betäubung der Versuchstiere

Pentobarbital Natrium (Nembutal, Ceva, Bad Segeberg)

Perfusionspuffer

118 mM NaCl/l
6,0 mM KCl/l
2,5 mM Na_2HPO_4/l
2,0 mM NaH_2PO_4/l
20 mM $NaHCO_3$/l
50 mM Phenolrot/l (Gibco Bio-Cult, Karlsruhe)

Der pH-Wert wurde auf pH 7,4 eingestellt. Die jeweils für den Versuch frisch angesetzte Lösung wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4 - 8°C aufbewahrt, dann auf Raumtemperatur aufgewärmt und mit 100 U/l Heparin (Liquemin, Hoffmann-La Roche, Genzach-Wyhlen) versetzt.

Fixierungslösungen

a) Cacodylat-Puffer
10 mM Cacodylat/l (Merck, Darmstadt)
2 mM $CaCl_2$/l
150 mM Saccharose/l
pH eingestellt mit 0,1 n HCl auf pH 7,4

b) Glutaraldehyd/Puffer-Gemisch

Glutaraldehyd 25 % in H_2O (Serva, Heidelberg)

0,7 %ige Lösung in Cacodylat-Puffer

c) Osmium Tetroxid/Puffer-Gemisch

Osmium Tetroxid kristallin (Heraeus, Osterode)

1 %ige Lösung in Cacodylat-Puffer

d) Tannin/Puffer-Gemisch

Tannin gepulvert (Merck, Darmstadt)

1 %ige Lösung in Cacodylat-Puffer

Einbettungsmedium (Epoxid-Einbettung)

Spurrsches Medium ("Spurr") nach Spurr (1969)

Objektträger

Kupfer-Netzchen (Polaron, Watford)

3 mm Durchmesser, 100 hexagonale Maschen bzw.
200 quadratische Maschen

Objektträgerfolie

Formvar 15/95 E (Serva, Heidelberg)

0,4 %ige Lösung in Dichloräthylen

Kontrastierlösungen

a) Uranyl Acetat-Lösung

Uranyl Acetat p.a. (Merck, Darmstadt)

1 %ige Lösung in Aqua bidest.

b) Blei Citrat-Lösung

0,4 % Pb Citrat

0,4 % NaOH in Aqua bidest.

3.3. Methoden

3.3.1. Versuchsdurchführung

Es wurde eine Milz und ein halber Thymus pro Rezipient verwandt. Die Organe wurden aus den Donormäusen exzidiert, in Eagle's Medium auf Eis (Temperatur ca. + 4°C) vorsichtig zerrieben und durch ein Stahlsieb (Porengröße ca. 0,3 mm) filtriert. Das Filtrat wurde 10 min bei 150 g zentrifugiert, der Oberstand abgegossen und das Zell-Pellet in 2 ml Eagle's Medium resuspendiert. Die resultierenden Milz- bzw. Thymus-Zellsuspensionen enthielten nach der Trypanblau-Exklusionsmethode 85 - 90 % lebende Zellen. Die Lymphozyten-Dichte wurde mit einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärben mit Kristallviolett bestimmt und mit Eagle's Medium auf $1{,}0 \pm 0{,}1 \times 10^8$ Zellen pro ml eingestellt.

Diese Suspensionen wurden halbiert und die eine Hälfte mit 30 µl Neuraminidase/ml Suspension versetzt ($\hat{=} 3 \cdot 10^{-4}$ U Neuraminidase/ml Suspension). Beide Proben wurden 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal mit Eagle's Medium gewaschen.

Jeder Rezipient erhielt 1 Stunde vor Versuchsbeginn eine Injektion von 0,15 ml der verdünnten Latex-Lösung in die Schwanzvene. Bei Versuchsbeginn wurden je 0,5 ml der Neuraminidase- oder scheinbehandelten Lymphozyten-Suspension injiziert.

Pro Versuchsgruppe (Neuraminidase-Behandlung/Kontrolle, 1 bzw. 3 Stunden Versuchsdauer, Thymus-/Milz-Lymphozyten) wurden 2 Versuchstiere angesetzt. Für Thymozyten wurde nur ein 1 Std.-Versuch durchgeführt.

3.3.2. Präparation der Leber

1 bzw. 3 Stunden nach Versuchsbeginn wurden die Mäuse mit Pentobarbital (80 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal betäubt.

Nach Laparotomie, Darstellung und Kanülierung der Vena portae mit einer Kunststoff-Verweilkanüle (Argyle 20 G, Sherwood, St. Louis) und herznaher Durchtrennung der Vena cava inf. erfolgte die Perfusion der Leber mit

a) Perfusionspuffer bis zur Entfärbung der Leber (max. 2 ml)
b) Glutaraldehyd/Puffer-Gemisch bis zur Verhärtung der Leber (max. 4 ml).

Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug max. 1 ml/min. Nach Hepatektomie wurde der spitz zulaufende Rand der Leberlappen abgetrennt und in Stückchen von ca. 1 mm^3 Größe geschnitten.

Diese Perfusionsfixierung (vgl. Kolb-Bachofen und Kolb, 1979) wurde aus zwei Gründen gewählt.

1) Durch die initiale Perfusion sollten sämtliche nicht adhärenten Bestandteile des Blutes aus den Sinusoiden hinausgespült werden. Heparin erzeugt eine Dilatation der Sinusoide und wirkt einer Thrombenbildung entgegen.

2) Die anschließende Perfusion mit dem Fixierungsmedium ergibt eine wesentlich homogenere Fixierung als bei einer Immersionsfixierung.

3.3.3. Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie

3.3.3.1. Einbettung

Alle Stückchen wurden in Osmium Tetroxid/Puffer-Gemisch 3 Std. nachfixiert und anschließend in einer aufsteigenden Äthanolreihe (70, 90, 96 %, zweimal absolut) je 30 min lang inkubiert. Nach Austausch des Äthanols gegen Spurr'sches Medium über je 3 Std. mit Äthanol/"Spurr" (1 : 1) und reinem "Spurr" wurden die Proben in "Spurr"-gefüllte Gelatine-Kapseln eingesetzt und 3 bis 6 Tage lang bei 70°C gehärtet.

Ein Teil der Proben wurde vor der Osmium Tetroxid-Nachfixierung 1 Std. lang in Tannin/Puffer-Gemisch inkubiert bei sonst identischem Vorgehen.

3.3.3.2. Herstellung der Schnittpräparate

Mittels eines Reichert Ultracut Mikrotoms und eines Diamantmessers (Diatome, Bienne) wurden von den Proben graue Schnitte (Dicke ca. 60 nm) hergestellt und auf Kupfer-Netzchen aufgefangen. Für Obersichtsaufnahmen wurden Netzchen mit 100 Maschen verwendet, die mit einer Objektträgerfolie aus 0,4 %iger Formvar-Lösung versehen waren. Die Präparate wurden mit Uranyl Acetat-Lösung (5 min) und Blei Citrat-Lösung (1 min) kontrastiert.

3.3.4. Elektronenmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Schnittpräparate erfolgte mit einem Siemens Ia-Elektronenmikroskop. Für Aufnahmen mit höherer Vergrößerung wurde ein Philips EM 400 verwandt.

Alle Lymphozyten wurden fotografiert und auf ihre Kontaktzellen sowie die Struktur der Kontakte hin untersucht.

Zur semiquantitativen Auswertung wurden auf Schnitten von 2 Gewebeproben jeder Maus je 5 Einheitsflächen stichprobenartig ausgewählt. Eine Einheitsfläche entsprach einer hexagonalen Masche der den Schnitten unterliegenden Kupfer-Netzchen. Hierzu wurden nur Netzchen mit 100 Maschen und 3 mm Durchmesser verwandt; die Größe einer Einheitsfläche betrug ca. 0,2 mm^2.

3.3.5. Identifikation der Lymphozyten

Die Morphologie der Lymphozyten aus Milz und Thymus in situ oder nach Isolierung ist eingehend beschrieben worden (Abe und Ito, 1970; Veermann und van Ewijk, 1975; Matter, 1975). Lymphozyten mit ähnlicher Morphologie wurden auch in den Leberpräparaten nach Injektion der betreffenden Zellsuspension festgestellt und durch folgende gemeinsame Eigenschaften identifiziert: Größe im Medianschnitt ca. 4 - 12 µm; kompakter Kern, der höchstens gekerbt, niemals aber segmentiert ist; mittelgradig bis stark elektronentransparentes Zytoplasma; abgesehen von ca. 0,15 - 0,25 µm großen, stark elektronendichten Einschlüssen (sogen. azurophile Granula) keine weiteren Granula; keine Phagozytose von 0,81 µm Latex-Partikeln.

In Lebern von Versuchstieren, in die Milz-Lymphozyten injiziert worden waren, fanden sich vereinzelt Plasmazellen, kenntlich an dem reichhaltigen Vorkommen von rauhem endoplasmatischem Retikulum (rER).

Die übrigen Leukozyten lassen sich von den Lymphozyten einfach abgrenzen: Neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Makrophagen und Monozyten sind leicht durch ihre stets vorhandene Latex-Phagozytose zu identifizieren, Granulozyten außerdem durch ihren segmentierten Kern sowie ihre charakteristischen Granula.

Erythrozyten (homogenes Zytoplasma) und Thrombozyten (charakteristische Vakuolen und Granula) finden sich nach Injektion der Milz-Zellsuspension häufiger als nach Injektion der Thymus-Zellsuspension.

3.3.6. Identifikation der Zelltypen der Leber

Da die Retention ausschließlich in den Sinusoiden erfolgt, müssen die im Schnitt dargestellten Zellen in der Umgebung der Sinusoide den verschiedenen Zelltypen sicher zugeordnet werden können. Diese sind nach Wisse (1977) Kupfferzellen, Endothelzellen und Pitzellen (die sogenannten Sinusoidalzellen), sowie Hepatozyten als Parenchymzellen und Fettzellen.

Von diesen Zelltypen wurden Pitzellen (vgl. Wisse et al., 1976) nur zweimal gefunden und können deshalb vernachlässigt werden.

Fettzellen und Hepatozyten sind durch ihre Lage unter der Endothelschicht und durch ihre Morphologie einfach abzugrenzen.

Die Unterscheidung von Kupfferzellen und Endothelzellen ist im elektronenmikroskopischen Schnittpräparat schwierig. Dazu liegen an Rattenlebern eingehende Untersuchungen vor (vgl. Wisse, 1972 und 1974). Hier dienen zur Unterscheidung zunächst morphologische Kriterien (Lage, Form, Oberfläche, Vakuolen)(Wisse, 1977). Diese können bei Bedarf durch Peroxidase-Reaktion oder Latex-Phagozytose ergänzt werden, die ausschließlich in Kupfferzellen positiv ausfallen (Widmann, 1972).

Die Unterscheidungsmerkmale lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf die Mäuseleber übertragen: Stöhr et al. (1978) zeigten, daß 57 % der Mäuse-Endothelzellen ebenfalls, wenn auch schwach Peroxidase-positiv sind, und daß die morphologischen Verhältnisse identisch sind. Im Gegensatz dazu kamen Leeuw et al. (1982) zu dem Ergebnis, daß morpho-

logische Unterschiede zur Rattenleber bestehen. Sie stellten außerdem fest, daß 30 % der Kupfferzellen in der Maus Peroxidase-negativ sind.

Die Peroxidase-Reaktion fällt demnach zur Differenzierung der beiden Zelltypen aus. Auch morphologische Kriterien aus Rattenlebern sind nicht ohne weiteres auf die Mäuseleber übertragbar. So diente in den Versuchen der vorliegenden Arbeit als Grundlage zur Differenzierung der Sinusoidalzelltypen die Markierung mit Latex-Partikeln (Durchmesser 0,81 µm), die auch bei Mäusen ausschließlich in Kupfferzellen positiv ausfällt (Stöhr et al., 1978).

Tab. 1 zeigt die wichtigsten Kriterien zur elektronenmikroskopischen Differenzierung der Zelltypen der Mäuseleber.

4. ERGEBNISSE

Wie in der Einleitung geschildert, werden desialylierte, syngene Lymphozyten nach intravenöser Injektion aus dem Kreislauf der Rezipienten gefiltert und zunächst in der Leber zurückgehalten. Eine Subpopulation dieser Lymphozyten infiltriert das Leberparenchym.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Zelltypen der Leber - Hepatozyten, Fettzellen, Endothelzellen, Kupfferzellen - für die Retention der Asialo-Lymphozyten verantwortlich sind, d.h. zu welchen Leberzellen die adhärenten Lymphozyten Zell-Zell-Kontakte ausbilden. Außerdem sollte festgestellt werden, ob zu frühen Zeitpunkten nach der Injektion bereits Anzeichen einer Infiltration nachweisbar sind.

Dazu wurden desialylierte oder scheinbehandelte Lymphozyten aus Milz oder Thymus von BALB/c-Mäusen intravenös in syngene Empfänger-Mäuse injizert. Die Leber der Rezipienten wurde nach 1 oder 3 Std. perfusionsfixiert, wodurch alle nicht adhärenten Blutzellen aus den Sinusoiden herausgespült werden. Nach Aufbereitung der Gewebeproben für die Elektronenmikroskopie erlaubt eine Untersuchung dieser Proben daher Aussagen über die Zahl adhärenter Zellen sowie eine Analyse der Struktur der gebildeten Zell-Zell-Kontakte und deren Veränderung im Versuchszeitraum.

4.1. Semiquantitative Auswertung der Zahl adhärenter Lymphozyten in der Leber

Für die semiquantitative Auswertung wurde die durchschnittliche Anzahl der adhärenten Lymphozyten pro Einheitsfläche bestimmt. Tab. 2 und Fig. 1 geben die erhaltenen Werte für die einzelnen Versuchsgruppen wieder.

Der höchste Retentionswert findet sich für desialylierte Milz-Lymphozyten 1 Std. nach Injektion mit 3,42 adhärenten Lymphozyten pro Einheitsfläche. Nach weiteren 2 Stunden hat ein Teil der Asialo-Lymphozyten die Leber wieder verlassen. Bezogen auf den 1-Stunden-Wert ergibt sich ein Abfall um 21 % auf 2,71 Lymphozyten pro Einheitsfläche (Tab. 2, Fig. 1).

Auch bei den Kontrolltieren, denen scheinbehandelte Zellen injiziert wurden, werden Lymphozyten in der Leber zurückgehalten. Die Werte für scheinbehandelte Milz-Lymphozyten liegen jedoch signifikant tiefer und betragen nach 1 Std. 53 % und nach 3 Std. 29 % der Werte für desialylierte Lymphozyten (jeweils $p < 0{,}001$). Außerdem wandern die Kontroll-Lymphozyten schneller aus der Leber aus als Asialo-Lymphozyten; der Abfall gegenüber dem 1-Stunden-Wert beträgt hier 55 % (Fig. 1).

Bei gleicher Injektionsdosis zeigen Asialo-Thymozyten nach 1 Std. eine signifikant geringere Retention als desialylierte Milz-Lymphozyten (2,44 Lymphozyten pro Einheitsfläche, $p < 0{,}025$).

Kontroll-Thymozyten werden dagegen in größerem Ausmaß zurückgehalten als scheinbehandelte Milz-Lymphozyten. Der Anteil der adhärenten Kontroll-Thymozyten, bezogen auf den Retentionswert der desialylierten

Thymozyten beträgt 1 Std. nach Injektion 80 % ($p > 0,1$). Für Thymozyten unterscheiden sich Kontrolle und Neuraminidase-Behandlung daher nicht signifikant.

4.2. Morphologie der Kontakte zwischen Lymphozyten und den Zellen der Leber

Ein Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit war, die zur Retention der desialylierten Lymphozyten führenden Strukturen in der Leber zu untersuchen. Nach Perfusion der Leber sind die Sinusoide frei von Blutelementen bis auf die adhärenten Lymphozyten (Abb. 1). Die Durchmusterung von mehr als 600 Lymphozyten zeigt, daß an der Retention 3 Zelltypen beteiligt sind: Kupfferzellen, Endothelzellen und Hepatozyten. Die Kontakte der Lymphozyten zu diesen Zelltypen sind nachfolgend im einzelnen charakterisiert.

4.2.1. Kontakte zwischen Lymphozyten und Sinusoidalzellen

Kontakte zwischen Lymphozyten und Kupfferzellen bzw. Endothelzellen tragen überwiegend zur Retention der Lymphozyten in der Leber bei: 1 Std. nach Injektion zeigen 90 % der desialylierten Lymphozyten, deren Kontaktzonen in der Schnittebene liegen, Bindungen an Kupfferzellen oder Endothelzellen. 45 % der desialylierten Lymphozyten binden an Kupfferzellen, 53 % an Endothelzellen, 8 % zeigen gleichzeitig Kontakte zu beiden Zelltypen.

Die Kontakte der Lymphozyten zu Kupfferzellen sind sehr vielgestaltig, da kernnahes Zytoplasma und/oder Fortsätze beider Zelltypen in beliebiger Kombination Bindungen aufbauen können (Abb. 1, 2). Dementsprechend ist die Ausdehnung der Berührungsfläche variabel von Punktkontakten (Abb. 1, 2b) bis zu breiten Flächenkontakten mit weitgehend parallelen Zellmembranen (Abb. 2a, b).

Zu Endothelzellen nehmen die Lymphozyten dagegen ausschließlich über die Spitzen ihrer Mikrovilli Kontakt auf (Abb. 3). Die Berührungszone ist hier stets klein, fast punktförmig, mit einer maximal gemessenen Ausdehnung von 0,2 µm. Flächenhafte Kontakte wurden nicht beobachtet. Die Kontakte zu Endothelzellen waren häufig im Bereich von sogen. "coated pits" zu erkennen (Abb. 4c, 8a). Diese Strukturen sind flache Einbuchtungen der Zellmembran, die auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite mit einem sogen. Stachelsaum ("bristle coat") versehen sind (vgl. Goldstein et al., 1979; Pearse und Bretscher, 1981).

Nach Anfärben der Glykokalix mit Tanninsäure/OsO_4 stellen sich im Bindungsbereich zwischen Lymphozyten und Kupfferzellen elektronendichte "Brücken" dar, die parallel zueinander verlaufen (Abb. 4a, b).

Im Bereich der Punktkontakte von Lymphozyten und Endothelzellen stellen sich ebenfalls "Brücken" dar, die jedoch divergent von der Spitze des Lymphozyten-Mikrovillus ausstrahlen (Abb. 4c, d).

Ein weiterer, wesentlicher Unterschied besteht im Abstand der beiden Plasmamembranen im Kontaktbereich: Die Membranen von Lymphozyten und Kupfferzellen sind in der Kontaktzone 30 - 60 nm voneinander entfernt. Die Membranen von Lymphozyten und Endothelzellen haben dagegen in der

Mitte der Punkt-Kontakte einen Abstand von nur 3 - 8 nm (im Mittel 5 nm). Gelegentlich ist die äußere Membranlage als Folge des Perfusionszugs abgehoben (Abb. 4c).

Die Morphologie der Zell-Zell-Kontakte ist in allen Versuchsgruppen gleich - d.h. es ist kein Unterschied in den Kontaktstrukturen erkennbar, ob der Bindungspartner ein Milz- oder Thymus-Lymphozyt ist oder ein gebundener Kontroll-Lymphozyt. Die semiquantitative Auswertung der Breite der Zellkontakte (Tab. 3) ergibt jedoch bezüglich der Kupfferzellen Unterschiede zwischen Versuch und Kontrolle sowie zwischen 1- und 3-Stunden-Ansätzen: Lymphozyten zeigen nach Neuraminidase-Behandlung einen höheren Anteil flächiger Kontakte zu Kupfferzellen als die Kontroll-Lymphozyten sowie eine deutliche Zunahme dieser Kontaktfläche nach 3 Stunden (Tab. 3, Abb. 2a, b). Die Kontakte zu Endothelzellen sind dagegen stets wesentlich kleiner (Punktkontakte) und zeigen keine Unterschiede in ihrer Ausprägung zwischen den Versuchsgruppen (Tab. 3, Abb. 3a, b).

4.2.2. Kontakte zwischen Lymphozyten und Parenchymzellen

Nach Wisse (1977) sind Hepatozyten vom Lumen der Sinusoide stets durch die endotheliale Auskleidung abgeschirmt. Es wurde daher als unwahrscheinlich angesehen, daß sich die Hepatozyten an der primären Retention der Lymphozyten beteiligen (Steer et al., 1980). In den hier untersuchten Mäuselebern finden sich dagegen häufig Hepatozyten-Mikrovilli, die durch eine Pore im Endothel bis zu 0,7 µm in das Lumen des Sinusoids ragen (Abb. 5a). Außerdem zeigen 15 - 20 % der desialylierten

Lymphozyten Kontakte zu Hepatozyten. Die Bindung erfolgt entweder punktförmig an die genannten Mikrovilli (Abb. 5a) oder flächig über Hepatozyten-Mikrovilli, die weit und teilweise in Gruppen aus der Fenestrierung des Endothels herausragen (Abb. 5b).

Im Tanninsäure/OsO_4-Kontrast beträgt der Abstand der Plasmamembran von Lymphozyten und Hepatozyten im Mittel ca. 5 nm wie bei Endothelzellen. Zwischen den Membranen ist elektronendichtes Material zu erkennen, das nicht in Brücken aufgelöst werden kann (Abb. 8d).

4.3. Anzeichen der beginnenden Infiltration adhärenter Lymphozyten in die Leber

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die morphologische Untersuchung der beginnenden, autoimmunen Infiltration desialylierter Lymphozyten in der Leber.

Allgemein wird unter Infiltration das Bestreben von Zellen verstanden, ihren ursprünglichen Gewebeverband zu verlassen und in einen angrenzenden, andersartigen Verband unter Zerstörung dort vorhandener Strukturen einzudringen.

Im vorliegenden Fall bedeutet dies, daß die Lymphozyten bzw. deren Ausläufer von den Sinusoiden ausgehend in das umliegende Lebergewebe eindringen. Als infiltrierend wurden alle Lymphozyten definiert, deren Mikrovilli durch das Endothel in den Disseschen Raum ragen, wo sie Kontakte mit den Parenchymzellen ausbilden (z.B. Abb. 7).

Die Untersuchung der fortgeschrittenen Infiltration nach 5 wöchentlichen Injektionen desialylierter Lymphozyten zeigte, daß die Lymphozyten durch Mikrovilli infiltrieren, deren Spitzen in Einbuchtungen (sogen. "Invaginationen") der Zielzellen liegen. Derartige Invaginationen wurden an Endothelzellen und Hepatozyten beobachtet, die auch Zeichen der beginnenden Zytolyse aufwiesen (Kolb-Bachofen und Kolb, 1979). In der vorliegenden Arbeit wurden daher auch solche Lymphozyten als zytotoxisch aktiv und somit als infiltrierend angesehen, deren Zellfortsätze Invaginationsstrukturen mit Zellen der Leber gebildet haben. Bereits 1 Stunde nach Injektion der Lymphozyten finden sich nach dieser Definition Anzeichen einer beginnenden Infiltration der Lymphozyten in die Leber. Die Auswertung von mehr als 100 Anschnitten infiltrierender Lymphozyten ergab, daß Lymphozyten-Mikrovilli in Plasmamembran-Invaginationen nur an Endothelzellen (Abb. 6) und Hepatozyten (Abb. 7b, c, d) beobachtet werden können.

An Fettzellen werden keine Invaginationen gesehen. Fettzellen treten im Vergleich zu den Sinusoidalzellen nur in geringer Anzahl auf und sind deshalb entsprechend selten in der Nähe eines infiltrierenden Lymphozyten anzutreffen.

An Kupfferzellen werden ebenfalls keine Invaginationen festgestellt (Abb. 7, 9). Fast regelmäßig ist in der Nähe eines infiltrierenden Lymphozyten auch eine Kupfferzelle angeschnitten (z.B. Abb. 6c). Ca. 60 % der infiltrierenden Lymphozyten weisen in der dargestellten Schnittebene direkten Kontakt zu Kupfferzellen auf (Abb. 7a - d, 9). Umgekehrt wird eine Phagozytose von morphologisch intakten Lymphozyten durch Kupfferzellen nicht festgestellt. Dagegen sind phagozytierte

Erythrozyten (Abb. 9), Granulozyten und Thrombozyten nach Injektion der Milz-Zellsuspension häufig zu beobachten.

Die Zielzellen sind morphologisch stets intakt. Zeichen der beginnenden Desintegration wurden nicht beobachtet. Nach semiquantitativer Untersuchung (Tab. 2, Fig. 2) zeigt sich 3 Stunden nach Injektion der desialylierten Milz-Lymphozyten eine signifikante Zunahme an infiltrierenden Lymphozyten um 95 % gegenüber dem 1-Stunden-Wert ($p < 0,05$). 3 Std. nach Injektion beträgt der Anteil der desialylierten Lymphozyten, die Anzeichen der Infiltration aufweisen (0,82 Lymphozyten pro Einheitsfläche), an der Gesamtzahl der adhärenten Lymphozyten (2,71 Lymphozyten pro Einheitsfläche) 30 %. Auch in den Kontrollen werden infiltrierende Lymphozyten gefunden, deren Zahl jedoch signifikant kleiner ist als nach Desialylierung ($p < 0,001$ nach 3 Std.).

Nach Injektion von Thymozyten sind die Anzeichen der beginnenden Infiltration schwächer ausgeprägt. Kontrolle und Versuch sind hier nicht signifikant verschieden ($p > 0,1$). Die Ultrastruktur der Zell-Zell-Kontakte, die als Zeichen der beginnenden Infiltration definiert wurden, ist nachfolgend beschrieben.

4.3.1. Invaginationsstrukturen an Endothelzellen

Neben den bereits beschriebenen, punktförmigen Kontakten von Lymphozyten zu Endothelzellen (s. 4.2.1.) finden sich auch Lymphozyten-Mikrovilli, die in Invaginationen der Endothelzellen-Plasmamembran ragen. Diese Invaginationen können unterschiedlich tief ausgeprägt

sein (Abb. 6a, b). Die Endothelzellen-Membran hat an der zum Lumen des Sinusoids hin gerichteten Öffnung der Invagination in den meisten Fällen Kontakt mit dem Mikrovillus (Abb. 6b, d).

Aus Gründen der Schnittebene werden auch Strukturen gefunden, bei denen der Lymphozyten-Mikrovillus Lumen- und Hepatozyten-seitig von einer Endothelschicht bedeckt ist (Abb. 8c,d). Geeignete Schnitte zeigen, daß es sich dabei um schräg angeschnittene Invaginationen handelt (Abb. 6d). Im Tanninkontrast beträgt der minimale Membranabstand wie bei den oben beschriebenen Punkt-Kontakten ca. 5 nm. Innerhalb der Invaginationen existieren jedoch auch flächige Kontakte mit einer maximal gemessenen Ausdehnung von 0,7 - 1,0 µm (Abb. 6a - c, 8a, c). Im Bindungsbereich stellt sich elektronendichtes Material dar, das nicht in Brücken aufgelöst werden kann (Abb. 8c).

4.3.2. Lymphozyten, deren Mikrovilli durch das Endothel in den Disseschen Raum ragen

Lymphozyten-Mikrovilli, die durch die Endothelschicht ragen, finden sich überwiegend im Bereich der dünnen Endothelzellfortsätze (Abb. 7c) oder der Siebplatten (Abb. 7a), nur in ca. 5 % der Fälle dagegen im Bereich dickerer (> 0,7 µm) Endothelschichten (Abb. 7b). Das Endothel erscheint in allen Fällen morphologisch intakt. Der maximale Durchmesser der Öffnungen wurde mit 1,2 µm gemessen.

Ca. 10 % der Infiltrationen ereignen sich im Zusammenhang mit weit aus einer Endothelöffnung herausragenden Hepatozyten-Mikrovilli (vgl. 4.2.2.). In diesen Fällen ist der Mikrovillus des infiltrierenden Lymphozyten von Hepatozyten-Mikrovilli bedeckt, die sich auf die Oberfläche des Lymphozyten fortsetzen (Abb. 5).

4.3.3. Invaginationsstrukturen an Hepatozyten

Da das Endothel auch 3 Std. nach Injektion in allen Fällen intakt ist, setzen Invaginationen an Hepatozyten voraus, daß die Mikrovilli der Lymphozyten durch die Endothelschicht ragen. Dabei ist aus Gründen der Schnittebene keine Aussage über die definitive Lage der Spitze der Mikrovilli möglich. Es werden jedoch alle Abstufungen gefunden, vom Kontakt mit den Hepatozyten-Mikrovilli im Disseschen Raum (Abb. 7c) bis zur Lage in max. 1,5 µm tiefen Invaginationen der Hepatozyten (Abb. 7b, c). Diese Strukturen sind gelegentlich im Querschnitt getroffen (Abb. 7b), durch den unterschiedlichen Elektronen-Kontrast des Zytoplasmas von Hepatozyten und Lymphozyten lassen sich die Mikrovilli jedoch einfach identifizieren. Die Feinstruktur der Kontakte von Lymphozyten und Hepatozyten in Invaginationen ähnelt der in Endothelzell-Invaginationen (Abb. 8d, vgl. 4.3.1.).

Nur 3 Std. nach Injektion von desialylierten Lymphozyten finden sich wenige Fälle, bei denen ein großer Zellfortsatz eines Lymphozyten in einer aufgeweiteten Invagination eines Hepatozyten liegt (Abb. 7d). Der Kern der Lymphozyten liegt jedoch stets im Lumen des Sinusoids.

Abgesehen von dieser Beobachtung lassen sich ähnlich wie bei der Retention keine morphologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nachweisen. Die Invaginationen erscheinen jedoch 3 Std. nach Injektion tiefer als nach 1 Std. (Abb. 7c, d). Um über die quantitative Zunahme infiltrierender Lymphozyten (s. Tab. 2, Fig. 2) hinaus ein Fortschreiten der Infiltration nachzuweisen, wurde der Anteil infiltrierender Lymphozyten bestimmt, die im Disseschen Raum oder in

Invaginationen Kontakt zu Hepatozyten aufgenommen haben. Es zeigt sich eine wesentliche Zunahme dieser Lymphozyten im Beobachtungszeitraum sowie eine stärkere Ausprägung der Infiltration nach Desialylierung (Tab. 3).

5. DISKUSSION

Zur Retention desialylierter Lymphozyten in der Leber existieren bislang ausschließlich Untersuchungen mit radioaktiv markierten Lymphozyten (vgl. Woodruff und Gesner, 1969; Woodruff und Woodruff, 1976; Steer et al., 1980), die keine morphologischen Aussagen erlauben. Daher konnte bislang nur indirekt geschlossen werden, daß die vermehrt über der Leber gemessene Strahlung aus lebenden Zellen und nicht etwa aus freigesetzten Isotopen stammt (Steer et al., 1980). Den direkten Nachweis liefert die vorliegende Arbeit durch die Beobachtung morphologisch intakter Lymphozyten in der Leber.

Für die Identität der morphologisch nachgewiesenen Lymphozyten mit der über der Leber gemessenen Radioaktivität spricht, daß beide Ansätze quantitativ weitgehend übereinstimmende Ergebnisse liefern. Der prozentuale Anteil der adhärenten Kontroll-Lymphozyten bezogen auf den Retentionswert der desialylierten Lymphozyten ist 1 Std. nach Injektion der Lymphozyten bei beiden Ansätzen annähernd gleich: Er beträgt im eigenen Material bei Milz-Lymphozyten 53 % (vgl. 4.1.). Steer et al. (1980) messen in der Kontrolle 21,9 % der injizierten Dosis, nach Injektion desialylierter Lymphozyten 37,7 %. Daraus ergibt sich ein Verhältnis von 57 % der adhärenten Kontroll-Lymphozyten, bezogen auf die desialylierten Lymphozyten.

Nach 3 Std. hat ein gewisser Teil der Lymphozyten die Leber wieder verlassen, und zwar bei den Kontroll-Lymphozyten in wesentlich stärkerem Ausmaß. Auch diese Ergebnisse stimmen mit den Messungen an radioaktiv markierten Lymphozyten überein: Woodruff und Gesner (1969)

finden gegenüber dem 1 Std.-Wert einen Abfall der Retentionswerte von 33 % in den Kontrollen sowie von 12 % nach Neuraminidase-Behandlung. Im eigenen Material betragen die entsprechenden Werte 55 % bzw. 21 % (s. 4.1. und Fig. 1).

Der hier verwandte semiquantitative Auswertungsmodus erlaubt demnach zuverlässige Aussagen über die Retention der Lymphozyten in der Leber.

5.1. Mechanismen, die zu einer Retention desialylierter Lymphozyten in der Leber führen können

Folgende Mechanismen, die zur Retention von syngenen Asialo-Lymphozyten in der Leber führen, werden von verschiedenen Autoren diskutiert:

1) Erkennung der noch auf der Plasmamembran der Lymphozyten haftenden Neuraminidase durch die Zellen der Leber.

2) Bindung von natürlichen Antikörpern an das T-Antigen auf der Plasmamembran der Asialo-Lymphozyten und Erkennung der gebundenen Antikörper durch den F_c-Rezeptor auf Kupfferzellen.

3) Bindung der terminalen Galaktosyl-Reste auf der Plasmamembran der Asialo-Lymphozyten durch Galaktose-spezifische Rezeptoren auf den Zellen der Leber.

zu 1): Zunächst ist eine Bindung über unvollständig von der Oberfläche der Lymphozyten abgewaschene Neuraminidase entweder direkt oder nach Beladung mit Neuraminidase-spezifischen Antikörpern zu diskutieren.

Nach Neuraminidase-Behandlung von Lymphozyten finden Vierling et al. (1978) bei gleicher experimenteller Prozedur wie in dieser Arbeit weder im Überstand der letzten Waschung noch in Zell-Lysaten Rest-Neuraminidaseaktivität. Lüben et al. (1976) berichten dagegen, daß das Enzym trotz gründlicher Waschungen auf der Zelloberfläche haften bleibt.

Um eine Beteiligung der Neuraminidase an der Retention der Lymphozyten auszuschließen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Experimente auch mit Lymphozyten aus dem Thymus durchgeführt. Im Cortex des Thymus existiert eine Subpopulation von Lymphozyten, die keine Reaktion auf Alloantigene und Mitogene zeigen und deshalb als unreife Vorstufen angesehen werden. Diese "corticalen" Lymphozyten zeigen Bindungsspezifität für PNA (peanut agglutinin, ein Lektin aus der Erdnuß, Arachis hypogaea), das spezifisch D-Galaktosyl-Reste erkennt (Pereira et al., 1976); sie exponieren also terminale Galaktosyl-Reste auf ihrer Plasmamembran (Reisner et al., 1976; Raedler et al., 1981). Der Anteil dieser Subpopulation beträgt 80 - 95 % der Thymozyten (Matter et al., 1975; Reisner et al., 1976).

In der vorliegenden Arbeit wurde ermittelt, daß die scheinbehandelten Thymozyten im Vergleich zu den desialylierten zu 80 % zurückgehalten werden. Dies entspricht genau dem Prozentsatz der PNA-positiven Thymozyten an der Gesamtpopulation. Daraus kann geschlossen werden, daß der hohe Retentionswert der Kontroll-Thymozyten auf die Subpopulation zurückzuführen ist, die terminale Galaktosyl-Reste exponiert. Die Erkennung der Neuraminidase selbst oder über Neuraminidase-spezifische Antikörper kann daher für die Retention der Lymphozyten ausgeschlossen werden.

zu 2): Nach Neuraminidase-Behandlung exponieren Lymphozyten das sogen. Thomsen-Friedenreich-(T-)Antigen (Watkins, 1979), dessen immunogene Determinante ßD-Galaktose (1—>3) αN-Acetyl-D-Galaktosamin ist (Vaith und Uhlenbruck, 1979). Die Seren von Menschen sowie der meisten Tierspezies enthalten natürliche Anti-T-Antikörper, wahrscheinlich aufgrund kontinuierlicher Stimulation durch Bakterien (Rosenberg und Schwarz, 1974; Springer et al., 1979). Es konnte gezeigt werden, daß die natürlichen Autoantikörper gegen durch Desialylierung freigelegte Stukturen sowohl den IgM als auch zu einem geringen Teil den IgG zugehörig sind (Haegert, 1977), und daß die Bindung an die Zelloberfläche über die F_{ab}-Region erfolgt (Winchester et al., 1975).

Auf Kupfferzellen sind zwei immunspezifische Erkennungsmechanismen beschrieben worden, über die Blutzellen gebunden werden können:

a) Erythrozyten werden nach Beladung mit IgM und Komplement über C_{3b}-Rezeptoren von Kupfferzellen aus dem zirkulierenden Blut entfernt. Durch eine Vorbehandlung mit CVF (cobra venom factor), der die Komplementfaktoren absorbiert, verlieren Meerschweinchen diese Fähigkeit (Schreiber und Frank, 1972). Eine Bindung von desialylierten Lymphozyten an Kupfferzellen über den C_{3b}-Rezeptor ist jedoch unwahrscheinlich, da eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit CVF nicht zur Blockierung der Retention in der Leber führt (Steer et al., 1980).

Ein weiterer immunspezifischer Erkennungsmechanismus führt über F_c-Rezeptoren auf Kupfferzellen (Munthe-Kaas, 1976; Steer et al., 1978). Die Vorinkubation der desialylierten Lymphozyten mit IgG-F_{ab}-Fragmenten aus nicht immunisierten, syngenen Mäusen senkt die Retentionswerte auf das Niveau der Kontroll-Lymphozyten (Steer et al., 1980).

Daraus schlossen diese Autoren auf eine Beladung der Asialo-Lymphozyten mit IgG und die anschließende Bindung an den F_c-Rezeptor.

Gegen den F_c-Rezeptor als Mediator der Retention spricht jedoch, daß die Bindung von desialylierten Ratten-Lymphozyten an Kupfferzellen in vivo auch in serumfreiem Medium erfolgt (Kolb et al., 1979). Außerdem könnte die Beladung mit F_{ab}-Fragmenten allein aus sterischen Gründen eine Bindung durch Galaktose-spezifische Rezeptoren (s.u.) behindern.

zu 3): Ein Teil der Glykoproteine in der Glykokalix der Lymphozyten gehört zum komplexen Typ, d.h. der nach außen gerichtete Polysaccharidanteil enthält terminale Sialinsäure-(N-Acetyl-Neuraminsäure-)Reste und subterminale Galaktose-Reste in α-ketosidischer Bindung. Die Neuraminidase spaltet α-ketosidisch, über ihr C_2-Atom gebundene Sialinsäure-Reste ab (Hutchinson und Kabayo, 1977), wodurch die subterminalen Galaktose-Reste freigelegt werden.

Demnach kann als Mechanismus der Bindung an die Zellen der Leber die Erkennung der exponierten Galaktosyl-Reste durch spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen der Leber in Betracht gezogen werden.

Ein D-Galaktose-spezifischer Rezeptor in der Plasmamembran von Hepatozyten wurde erstmalig von Ashwell und Morell (1974) beschrieben. Dieses sogen. "hepatic binding protein" (HBP) ist inzwischen isoliert und eingehend charakterisiert worden (Ashwell und Harford, 1982).

Ein weiteres D-Galaktose-spezfisches Lektin wurde von Kolb et al. (1979) auf Kupfferzellen gefunden. Die Bindungsspezifität beider

Rezeptoren ist identisch (Kolb et al., 1980), jedoch binden die Rezeptoren auf Hepatozyten molekulare Liganden, während von den Kupfferzell-Rezeptoren multivalente Liganden bzw. Partikel erkannt werden (Kolb-Bachofen et al., 1982).

In vitro binden desialylierte Lymphozyten über diese Rezeptoren an Kupfferzellen (Kolb et al., 1979) und Hepatozyten (Novogrodsky und Ashwell, 1977; Kolb et al., 1978).

Eine Beteiligung der Galaktose-spezifischen Rezeptoren an der Retention der desialylierten Lymphozyten in vivo ist bislang nicht direkt nachgewiesen worden, da in vivo-Hemmversuche noch fehlen. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Leber-spezifische Akkumulation von desialylierten Erythrozyten, die in vitro eine den Asialo-Lymphozyten vergleichbare Bindungscharakteristik bezüglich Kupfferzellen und Hepatozyten zeigen (Kolb et al., 1979), in vivo durch Galaktose gehemmt werden kann (Müller et al., 1981; Kolb et al., 1981).

Über die in vivo an der Retention der Asialo-Lymphozyten in der Leber beteiligten Zelltypen waren bislang in Ermangelung einer morphologischen Studie nur Vermutungen möglich (Kolb et al., 1978; Steer et al., 1980). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die desialylierten Lymphozyten über Kontakte zu Kupfferzellen, Endothelzellen und Hepatozyten zurückgehalten werden.

Dieses Ergebnis stimmt mit dem Verteilungsmuster der Bindung von desialylierten Glykoproteinen an die Zellen der Leber in vivo überein:

Die in vivo-Bindung von Asialo-Glykoprotein-Partikeln (gekoppelt an elektronendichte kolloidale Goldpartikel) an Kupfferzellen konnte

kürzlich direkt sichtbar gemacht werden (Kolb-Bachofen et al., 1983). Damit übereinstimmend zeigt die vorliegende Arbeit, daß ca. 45 % der adhärenten Asialo-Lymphozyten 1 Std. nach Injektion Kontakte zu Kupfferzellen aufweisen.

Für Hepatozyten ist die Bindung von molekularen Asialo-Glykoproteinen, die das Korpuskularfilter der Endothel-Fenestrae passieren können, seit längerer Zeit bekannt (Hubbard et al., 1979; Steer und Clarenburg, 1979; Kolb-Bachofen et al., 1983). Eine Beteiligung an der Retention wurde jedoch bislang wegen ihrer Abschirmung durch die Sinusoidalzellen nicht für möglich gehalten (Steer et al., 1980). Im Gegensatz dazu zeigt die vorliegende Arbeit, daß Hepatozyten mit ihren Mikrovilli durchaus ins Lumen der Sinusoide reichen, und daß 15 - 20 % der desialylierten Lymphozyten über Kontakte zu diesen Mikrovilli in der Leber zurückgehalten werden.

Ein perfusionsbedingtes Artefakt (z.B. eine Endothelzerreißung mit anschließender Bindung an freiliegende Hepatozyten-Mikrovilli) ist auszuschließen, da das Endothel stets intakt erschien und bis zu 1 µm in das Lumen der Sinusoide ragende Hepatozyten-Mikrovilli auch in immersionfixierten Lebern festgestellt wurden (eigene Beobachtung).

Gruppenweise und weiter als 1 µm ins Lumen ragende Mikrovilli wurden jedoch nicht ohne Anwesenheit von Lymphozyten beobachtet. Hier handelt es sich wahrscheinlich um einen perfusionsbedingten Effekt, bei dem an Hepatozyten-Mikrovilli adhärente Lymphozyten durch den Perfusionsdruck Mikrovilli der Hepatozyten weiter ins Lumen des Sinusoids ziehen.

An Endothelzellen ist eine Bindung von desialylierten Blutzellen bislang weder in vitro noch in vivo beschrieben worden. Erst neueste Ergebnisse zeigen, daß in vivo neben Kupfferzellen und Hepatozyten auch Endothelzellen Asialo-Fetuin (ein desialyliertes Glykoprotein), das an kolloidale Goldpartikel adsorbiert ist, binden und aufnehmen (Kolb-Bachofen et al., 1983). Es ist daher möglich, daß auch in der Membran dieses Zelltyps ein Rezeptor mit Spezifität für Galaktose existiert. Die voranstehenden Ergebnisse zeigen, daß Endothelzellen in der Lage sind, Kontakte zu desialylierten Lymphozyten zu bilden, und daß diese Bindung mit ca. 53 % einen wesentlichen Anteil an der Retention hat. Obwohl daraus alleine kein Rückschluß auf den zugrunde liegenden Mechanismus gezogen werden kann, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, daß ein Galaktose-spezifischer Rezeptor auch auf Endothelzellen vorkommen könnte.

Die Kontaktstellen der desialylierten Lymphozyten zeigen an jedem der genannten Zelltypen der Leber charakteristische morphologische Eigenschaften:

Zu Kupfferzellen werden Kontakte mit stark variierender Bindungsfläche aufgebaut, zu Endothelzellen dagegen nur punktförmige an den Spitzen der Lymphozyten-Mikrovilli. Die Bindung an Hepatozyten erfolgt punktförmig oder flächig über Hepatozyten-Mikrovilli, die aus der Fenestrierung des Endothels herausragen.

Diese Unterschiede können unter Berücksichtigung der jeweiligen Zellform sowie jüngster Ergebnisse über das Verteilungsmuster der Bindungsstellen für Asialo-Glykoproteine auf der Oberfläche der betreffenden Zelltypen erklärt werden.

Kupfferzellen können im Gegensatz zu Endothelzellen Pseudopodien ausbilden und große Partikel phagozytieren, wobei sich die Zellmembran über größere Strecken den Kontaktobjekten anpaßt (Wisse, 1974). Dadurch ergeben sich insbesondere flächige Kontakte, die auch in vitro beobachtet werden (Kolb et al., 1979).

Studien mit Asialo-Glykoproteinen, die an kolloidale Goldpartikel (Durchmesser 5 - 50 nm) adsorbiert sind, zeigen, daß die Bindungsstellen für diese Liganden auf Kupfferzellen und auf Endothelzellen in Gruppen (sogen. "cluster") zusammengefaßt sind. Diese cluster finden sich auf Kupfferzellen auf der gesamten Plasmamembran verteilt (Kolb-Bachofen et al., 1982). Auf Endothelzellen sind sie dagegen auf die "coated pits" beschränkt und dort fixiert (Kolb-Bachofen et al., unveröffentlicht). Die Bindung von Lymphozyten an coated pits auf Endothelzellen konnte in der vorliegenden Arbeit oft beobachtet werden, obwohl die Kontrastierungsbedingungen nicht ideal für die Darstellung des Stachelsaums ("coat") dieser Strukturen sind. Die ausschließlich punktförmigen Kontakte der Lymphozyten zu Endothelzellen könnten durch eine Fixierung der Rezeptoren in den coated pits erklärt werden.

Auf Hepatozyten sind die Bindungsstellen für Asialo-Glykoproteine einzeln auf der Plasmamembran verteilt (Kolb-Bachofen, 1981). Aufgrund dieses Verteilungsmusters sind sowohl Punkt- als auch Flächenkontakte möglich, die in dieser Arbeit wie auch in vitro (Kolb et al., 1978) nachgewiesen wurden.

Die unterschiedlichen Abstände zwischen den Membranen der Lymphozyten und denen ihrer Kontaktzellen (bei Kupfferzellen 30 - 60 nm, Hepato-

zyten 5 nm, Endothelzellen 5 nm) stimmen mit den Verhältnissen nach Bindung von Glykoprotein-Gold-Konjugaten überein. Hier weisen die elektronendicht dargestellten Goldpartikel zur Membran der Kupfferzellen einen wesentlich größeren Abstand auf als zur Membran von Endothelzellen und Hepatozyten (Kolb-Bachofen et al., 1982; Kolb-Bachofen, 1981; Kolb-Bachofen et al., 1983).

Die mit dem Verteilungsmuster der Bindungsstellen für Asialo-Glykoproteine im Einklang stehenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind ein weiterer Hinweis darauf, daß die Retention der desialylierten Lymphozyten durch Bindung an den Galaktose-spezifischen Rezeptor auf Kupfferzellen, Hepatozyten sowie wahrscheinlich auch auf Endothelzellen erfolgt.

Als Kontrolle für nicht Galaktose-exponierende Lymphozyten dienten scheinbehandelte Milz-Lymphozyten. Auch diese Lymphozyten zeigen eine nennenswerte Retention sowie morphologisch identische Bilder der Zell-Zell-Kontakte, verglichen mit den Asialo-Lymphozyten. Eine mäßige Bindung bzw. Retention von Kontroll-Lymphozyten ist aus früheren in vitro- und in vivo-Untersuchungen bereits bekannt (Kolb et al., 1978; Kolb et al., 1979; Steer et al., 1980).

Über den Mechanismus, der zur Retention der Kontroll-Lymphozyten führt, kann nur spekuliert werden. Milz-Lymphozyten zeigen in situ zu ca. 5 % PNA-Bindung, d.h. exponierte Galaktosyl-Reste (London et al., 1978). Diese PNA-positiven Milz-Lymphozyten können die Retention der Kontroll-Lymphozyten jedoch allein nicht erklären, da in diesem Fall in den Kontroll-Experimenten wesentlich niedrigere Retentionswerte zu erwarten wären.

Eine Erklärungsmöglichkeit wäre eine mechanische Schädigung der Plasmamembran einiger Lymphozyten bei der Isolation aus der Milz. Dabei könnten entweder kryptische Galaktose-Reste aufgedeckt werden oder andere Membranveränderungen stattfinden, die zu einer Erkennung dieser Lymphozyten durch die Zellen der Leber führen.

Aus dem Abfall der Retentionswerte sowohl der Asialo- als auch der Kontroll-Lymphozyten im Beobachtungszeitraum (vgl. Tab. 2) kann geschlossen werden, daß ein Teil der adhärenten Lymphozyten die Leber wieder verläßt. Dies steht im Einklang mit Studien über das Verhalten radioaktiv markierter Lymphozyten (Woodruff und Gesner, 1969; Woodruff und Woodruff, 1976), in denen gezeigt wurde, daß ca. 50 % der ursprünglich adhärenten Lymphozyten nach 48 Std. die Leber wieder verlassen und ein normales Zirkulationsmuster zeigen. Diese Reversion der Lymphozyten-Akkumulation in der Leber läßt sich am besten durch eine Neusynthese der Plasmamembran, hier vor allem der Membran-Glykoproteine der Lymphozyten erklären, wodurch normale Oberflächen- und damit normale Zirkulationseigenschaften wieder hergestellt werden.

5.2. Mechanismen, die zu einer Infiltration adhärenter Lymphozyten in die Leber führen können

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals die anfänglichen Stadien einer lymphozytären Infiltration der Leber beschrieben werden. Dazu wurden in dieser Arbeit Lymphozyten als infiltrierend definiert, wenn ihre Mikrovilli in den Disseschen Raum ragen oder - als Zeichen der

zytotoxischen Aktivität - wenn ihre Mikrovilli in Invaginationen der Zielzellen liegen (s. 4.3.).

Vergleichbare Strukturen werden auch in vitro bei den Kontakten von zytotoxischen Lymphozyten mit Zielzellen gefunden und als Träger der zytotoxischen Interaktion angesehen (Sanderson und Glauert, 1979). Die Morphologie dieser Kontakte unterscheidet sich nicht, wenn die Lymphozyten durch Antigene (Ryser und Sordat, 1977; Sanderson und Glauert, 1979), durch Antikörper (Glauert und Sanderson, 1979) oder durch Lektine (Kalina und Hollander, 1975) stimuliert werden. Es handelt sich also offenbar um ein vom Stimulationsmechanismus unabgängiges, einheitliches Reaktionsmuster zytotoxischer Lymphozyten.

Lymphozyten, die erste Anzeichen einer Infiltration zeigen, treten bereits eine Stunde nach Injektion der Zellsuspensionen aus Milz und Thymus auf. Daraus folgt, daß der Beginn der Infiltration innerhalb der ersten Stunde liegen muß. In den folgenden beiden Stunden nimmt die Infiltration quantitativ und qualitativ zu, jedoch liegt auch 3 Std. nach Injektion der Kern der Lymphozyten stets im Lumen des Sinusoids.

Die definitive Ausprägung der Infiltration, d.h. die Zerstörung des Endothels mit Auswandern der Lymphozyten in das benachbarte Leberparenchym sowie lytische Veränderungen an den Zielzellen, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden.

Erst nach einwöchiger Einwirkung desialylierter Lymphozyten wurden eine Zerstörung der Kapillarstruktur sowie lysierte Endothelzellen und Fettzellen gefunden (Kolb-Bachofen und Kolb, 1979). Nach fünf

wöchentlichen Injektionen finden sich auch lysierte Hepatozyten (Kolb-Bachofen und Kolb, 1979). Die vorliegende Arbeit ergibt demnach im Zusammenhang mit den genannten Langzeitergebnissen das Bild einer autoimmunen Infiltration, die innerhalb der ersten Stunde nach Injektion der desialylierten Lymphozyten beginnt und langsam progredient verläuft.

Auch in den Kontrollexperimenten, d.h. nach Injektion der scheinbehandelten Milz-Zellsuspension, werden infiltrierende Lymphozyten beobachtet, die sich morphologisch von den Asialo-Lymphozyten nicht unterscheiden. Ihre Zahl nimmt jedoch im Gegensatz zu den Versuchen mit Asialo-Lymphozyten im Beobachtungszeitraum nicht weiter zu.

Der Mechanismus, der die desialylierten Lymphozyten zur zytotoxischen Aktivität stimuliert, ist noch nicht geklärt. Eine Aktivierung durch die Neuraminidase-Behandlung kann ausgeschlossen werden, da desialylierte Lymphozyten in vitro in Abwesenheit zusätzlicher Stimulantien nicht zytotoxisch aktiv sind (Vierling et al., 1978). Außerdem ergibt die semiquantitative Auswertung für die infiltrierenden Kontroll-Thymozyten ähnliche Werte wie für desialylierte Thymozyten. Daher ist anzunehmen, daß die Lymphozyten durch den Kontakt mit den Zellen der Leber stimuliert werden.

Der klassische Mechanismus der zellulären Zytotoxizität von T-Lymphozyten läuft über die Erkennung von fremden Antigenen auf den Zielzellen durch spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Lymphozyten ab. Dieser Mechanismus scheidet ebenfalls aus, da syngene, gesunde Rezipienten verwandt wurden.

Die Kontakte der desialylierten Lymphozyten mit Kupfferzellen, Endothelzellen und Hepatozyten werden mit hoher Wahrscheinlichkeit gebildet durch die Bindung der terminalen Galaktosyl-Reste auf der Lymphozyten-Plasmamembran durch die Galaktose-spezifischen Rezeptoren in der Membran der Zellen der Leber (s. 5.1.). Diese Rezeptoren besitzen Lektin-Eigenschaften, da sie spezifisch Zuckermoleküle erkennen und binden (vgl. Barondes, 1981).

Allgemein ist eine Lektin-vermittelte Stimulation von T-Lymphozyten zur Zytotoxizität seit längerer Zeit bekannt (Perlmann und Holm, 1969). Dabei können die Bindungsstellen - bestimmte Zuckermoleküle in der Glykokalix - auf der Oberfläche nativer Lymphozyten exponiert sein (z.B. bei Concanavalin A oder Phytohämagglutinin), oder sie werden durch Neuraminidase-Behandlung freigelegt, z.B. bei PNA, das Spezifität für Galaktose besitzt. Auch das Galaktose-spezifische HBP kann desialylierte Lymphozyten zur Zytotoxizität aktivieren (Vierling et al., 1978).

Ob eine solche Stimulation auch durch die Galaktose-spezifischen Rezeptoren auf Kupfferzellen und Endothelzellen erfolgen kann, ist unbekannt, aber aufgrund der mit dem HBP identischen Spezifität (Kolb et al., 1980) wahrscheinlich. So könnte die Bindung der Lymphozyten durch die Galaktose-spezifischen Rezeptoren eine Subpopulation der adhärenten Lymphozyten zur Infiltration stimulieren.

Die Kontakte der desialylierten Lymphozyten mit Kupfferzellen zeigen im Gegensatz zu den Kontakten mit Endothelzellen und Hepatozyten besondere Eigenschaften: Invaginationen an Kupfferzellen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Nach mehrmaliger Injektion von desialylierten Lymphozyten fanden sich ebenfalls keine Invaginationen sowie keine Zeichen der Lyse (Kolb-Bachofen und Kolb, 1979). Daraus kann geschlossen werden, daß Kupfferzellen von zytotoxischen Lymphozyten nicht angegriffen werden.

Andererseits phagozytieren Kupfferzellen morphologisch intakte Lymphozyten nicht, im Gegensatz zu desialylierten Erythrozyten. Diese werden ebenfalls über Kontakte zu Kupfferzellen in der Leber zurückgehalten, anschließend jedoch von den Kupfferzellen phagozytiert (Jancik et al., 1978). Dieses Phänomen zeigt Parallelen zur in vitro-Phagozytose von Liposomen durch neutrophile Granulozyten (Munn und Parce, 1982). Diese synthetischen Partikeln werden nur phagozytiert, wenn sie bei gegebener Temperatur in fester Phase vorliegen und dadurch die Liganden auf der Oberfläche fest verankert sind. "Flüssige" Liposomen werden dagegen nicht aufgenommen (Munn und Parce, 1982). Der Trigger-Mechanismus zur Phagozytose ist wahrscheinlich die fehlende laterale Mobilität der Liganden auf der Partikeloberfläche. Bei einer sukzessiven Bindung der Liganden würden die betreffenden Partikel von der Plasmamembran der phagozytierenden Zelle vollständig umgeben (sogen. Reißverschluß-Phänomen, Silverstein et al., 1977). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch bei der Phagozytose von Erythrozyten durch Kupfferzellen eine Rolle spielen, da die Membran der Erythrozyten im Gegensatz zu der der Lymphozyten durch das unterliegende Spektringerüst relativ rigide ist (Marchesi, 1979).

Die semiquantitative Auswertung zeigt, daß desialylierte Lymphozyten wesentlich intensivere Kontakte zu Kupfferzellen unterhalten als Kontroll-Lymphozyten und daß die Breite der Kontaktflächen im Beobachtungszeitraum zunimmt.

Diese Entwicklung der Kupfferzell-Kontakte zeigt auffällige Parallelen zur Ausprägung der Infiltration (siehe Gegenüberstellung in Tab. 3), während sich Zahl und Breite der Endothelzell-Kontakte in allen Versuchs-

gruppen nicht wesentlich unterscheiden (Tab. 3). Außerdem weisen überdurchschnittlich viele infiltrierende Lymphozyten Kontakte zu Kupfferzellen auf (60 % gegenüber 45 % der Gesamtpopulation). Möglicherweise haben die Kupfferzellen der Leber über ihr Galaktose-spezifisches Lektin einen entscheidenden Anteil an der Stimulation der desialylierten Lymphozyten zur Infiltration.

Das hier untersuchte Modell einer lymphozytären Infiltration in die Leber bietet erstmalig die Gelegenheit, die initialen Abläufe einer diskreten Infiltration in vivo zu beobachten.

Im Gegensatz zu klinischen Biopsien bei Lebererkrankungen läßt sich der Beginn der Einwirkung der pathologischen Noxe mit der Injektion der desialylierten Lymphozyten genau festlegen. Außerdem ist es durch die Perfusion möglich, alle nicht adhärenten Blutzellen aus der Leber zu entfernen.

Das einzige bislang untersuchte, vergleichbare Modell bietet die Abstoßung von Leber-Allotransplantaten auf Nieren in ingezüchteten Mäusestämmen (Searle und Flaks, 1976). Hier beginnt die Infiltration 3 Tage nach der Transplantation, verläuft aber so rapide, daß die Leberarchitektur bereits nach weiteren 6 Tagen nicht mehr zu erkennen ist. Deshalb konnten auch hier die initialen Stadien der Infiltration nicht adäquat beschrieben werden. Es finden sich jedoch auch hier Lymphozyten, die das Endothel penetrieren und Mikrovilli in Invaginationen von Hepatozyten ausbilden.

Die Übertragbarkeit des hier untersuchten Modells der Retention und Infiltration desialylierter Lymphozyten auf klinische Krankheitsbilder ist unklar.

Aus dem Vorkommen von Neuraminidase-Aktivität bei einer Reihe von Bakterien und Viren (Drzeniek, 1972) kann jedoch vermutet werden, daß bei vielen Infektionen - vor allem bei chronischem Verlauf - ähnliche vorübergehende Leberschädigungen erfolgen.

Vergleichbare Infiltrationsvorgänge könnten auch bei der Ansiedlung von Metastasen maligner Tumoren in der Leber ablaufen. Verschiedene experimentelle wie auch menschliche Karzinome exponieren auf der Oberfläche ihrer Zellen auch ohne Neuraminidase-Behandlung das Thomsen-Friedenreich-Antigen (Springer et al., 1975; Codington et al., 1975), dessen immunogene Struktur endständige Galaktosyl-Reste aufweist (Vaith und Uhlenbruck, 1979; vgl. auch 5.1.). Für die Bindung von Zellen einer experimentell erzeugten Ratten-Leukämie (L 5222) an Kupfferzellen konnte kürzlich gezeigt werden, daß sie vom Galaktose-spezifischen Lektin vermittelt wird (Holl, 1981).

Schließlich führt die Kobalt-Bestrahlung von Lymphozyten in vitro zu einer Desialylierung (Banchereau et al., 1982). Ob der drastische Abfall der Lymphozyten-Werte im peripheren Blut nach Bestrahlung (Field et al., 1972) auf einer Retention von Lymphozyten in der Leber beruht, bleibt der weiteren Klärung vorbehalten.

Zusammenfassend ergab sich im Rahmen der vorgelegten Doktorarbeit folgendes:

Die Retention der desialylierten Lymphozyten in der Leber erfolgt über Kontakte zu Kupfferzellen, zu Endothelzellen sowie zu einem geringen Prozentsatz zu Hepatozyten, deren Mikrovilli durch das Endothel ragen. Durch den Kontakt zu den Zellen der Leber wird eine Subpopulation der Lymphozyten zur Infiltration stimuliert, wohingegen ein größerer Anteil die Leber wieder verläßt. Der zeitliche Beginn der Infiltration liegt innerhalb der ersten Stunde nach Injektion der Lymphozyten. Die initialen Stadien sind charakterisiert durch Mikrovilli, die in Invaginationsstrukturen der Endothelzellen lokalisiert sind oder durch das Endothel ragen und Kontakt mit Hepatozyten aufnehmen. Diese Anzeichen einer beginnenden Infiltration nehmen qualitativ und quantitativ während der folgenden 2 Stunden zu. Nekrosen von Zellen der Leber lassen sich auch 3 Std. nach Injektion nicht nachweisen.

Für die Retention und Stimulation zur Infiltration ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Exposition von Galaktose-Resten auf der Oberfläche der Lymphozyten nach Neuraminidase-Behandlung und deren Bindung durch Galaktose-spezifische Rezeptoren auf den Zellen der Leber verantwortlich. Eine Bindung infolge von auf der Lymphozytenoberfläche haften bleibenden Neuraminidasemolekülen kann aufgrund der Experimente mit unbehandelten und desialylierten Thymozyten ausgeschlossen werden.

Bezüge zu klinischen Krankheitsbildern ergeben sich durch das Vorkommen von Neuramindiase-Aktivität auf vielen infektiösen Agentien sowie durch die Galaktose-Exposition von Lymphozyten nach ionisierender Bestrahlung. Außerdem exponieren bestimmte Leukämie- und Karzinomzellen terminale Galaktose. Daher könnten vergleichbare Vorgänge wie die hier geschilderten zu einer Ansiedlung von Metastasen in der Leber führen.

	Kupfferzellen	Endothelzellen	Fettzellen	Hepatozyten
Lokalisation und Form	dem Endothel aufgelagert oder dieses über kurze Strecken ersetzend; kürzere Zellfortsätze	Auskleidung der Sinusoide; flache, lang gestreckte Zellfortsätze	unter der Endothelschicht; flache Zellfortsätze im Disseschen Raum	zwischen den Sinusoiden; polygonale Form
Oberfläche	unregelmäßig mit schmalen Pseudopodien, keine Fenestrae	glatt; Fenestrae, oft gruppenweise zu den Siebplatten zusammengefaßt	glatt; keine Fenestrae	kurze Mikrovilli im Disseschen Raum und in den Gallekanälchen, sonst glatt
spezifische Organellen	Phagozytose-Vakuolen, (u.a. Blutzellen, Zellfragmente, 0,81 µm Latex-Partikel) wurmartige Strukturen[1)]	keine Phagozytose, elektronentransparente Vakuolen (max. 3 µm groß) mit stark osmiophilem Material[2)]	keine Phagozytose, Fett-Vakuolen	keine Phagozytose, Glykogen-Schollen Fett-Vakuolen auffälliges rER
Zytoplasma-Matrix	elektronentransparent	elektronentransparent	elektronentransparent	elektronendicht

Tab. 1: Wichtige morphologische Kriterien zur elektronenmikroskopischen Differenzierung der Zelltypen der Mäuseleber

[1)] sogen. "canaliculi vermiformis" (Törö, 1962) [2)] s. Abb. 1

injizierte Lymphozyten	Neuraminidase-Behandlung	Std. nach Injektion	Anzahl der Mäuse	Anzahl der ausgewerteten Einheitsflächen	adhärente Lymphozyten pro Einheitsfläche[1)]	infiltrierende Lymphozyten pro Flächeneinheit[2)]
Thymus	-	1	2	26	1,96 ± 0,25	0,14 ± 0,07
Thymus	+	1	2	25	2,44 ± 0,29	0,18 ± 0,08
Milz	-	1	2	20	1,78 ± 0,31	0,30 ± 0,16
Milz	+	1	2	27	3,42 ± 0,32	0,42 ± 0,12
Milz	-	3	2	30	0,79 ± 0,13	0,20 ± 0,06
Milz	+	3	2	23	2,71 ± 0,34	0,82 ± 0,22

Tab. 2: Durchschnittliche Zahl der adhärenten bzw. infiltrierenden Lymphozyten pro Einheitsfläche (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwerts)

1) Aufgrund der Perfusion werden alle im Schnitt sichtbaren Lymphozyten als adhärent betrachtet (vgl. 4.2.)

2) Lymphozyten werden als infiltrierend definiert, wenn ihre Mikrovilli Infiltrationsstrukturen mit Zellen der Leber gebildet haben oder in den Disseschen Raum ragen (vgl. 4.3.)

Neuraminidase-Behandlung	Std. nach Injektion	Flächige Kontakte der Lymphozyten[1] zu Endothelzellen	zu Kupfferzellen	infiltrierende Lymphozyten mit Kontakt zu Hepatozyten[2]
-	1	-	-	-
-	3	+	++	+++
+	1	+	++	++
+	3	-	+++	++++

Tab. 3: Gegenüberstellung: Breite der Kontakte zwischen adhärenten Lymphozyten und Sinusoidalzellen versus Ausprägung der Infiltration

1) Anteil der Lymphozyten, deren Kontakte zu dem betreffenden Zelltyp > 1,0 µm Breite messen

2) Anteil der Lymphozyten, deren Mikrovilli durch das Endothel ragen und Kontakt zu Hepatozyten besitzen

-: < 15 %; +: 15 - 24 %; ++: 25 - 34 %; +++: 35 - 44 %; ++++: $\geq$ 45 %

Fig. 1

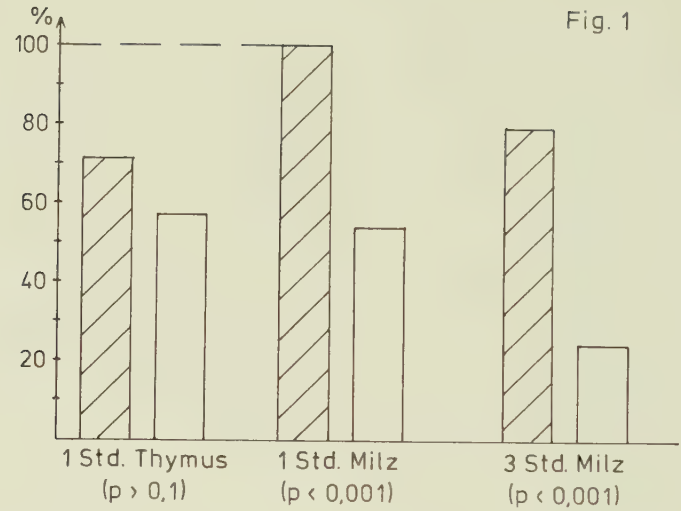
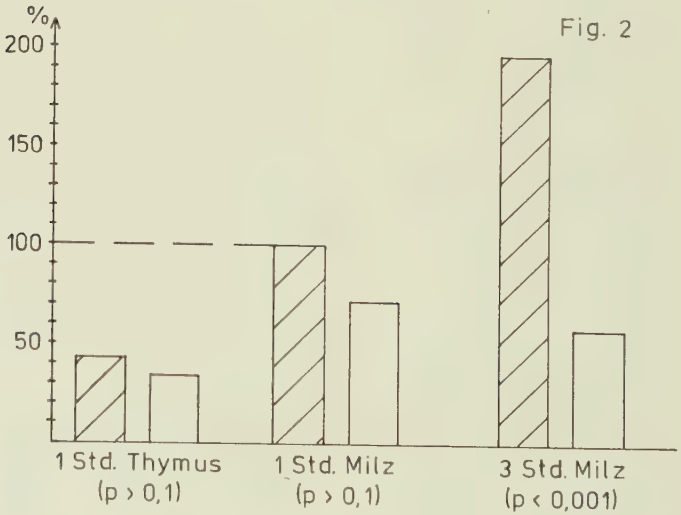


Fig. 2



Relative Zahl von adhärenten Lymphozyten (Fig. 1) bzw. Lymphozyten, die Anzeichen der beginnenden Infiltration zeigen (Fig. 2) in %, bezogen jeweils auf den Wert für desialylierte Milz-Lymphozyten 1 Std. nach Injektion (≙ 100 %). Die Signifikanzniveaus der Werte nach Neuraminidase-Behandlung (schraffiert) gegenüber den Kontrollwerten (nicht schraffiert) sind angegeben.

7. ABBILDUNGEN

Abb. 1. Struktur der Mäuseleber in Übersichtsvergrößerung
(Vergr. 9500 : 1)

Endothelzellen (En,x) und Kupfferzellen (Ku) bilden die Auskleidung der Sinusoide; Fe = Fettzelle, Hep = Hepatozyt, G = Gallekanal. Nach Perfusion der Leber sind die Sinusoide frei von Blutelementen bis auf adhärente Lymphozyten (Ly), hier im Punktkontakt mit einer Kupfferzelle (►).
→ : elektronentransparente Vakuole einer Endothelzelle

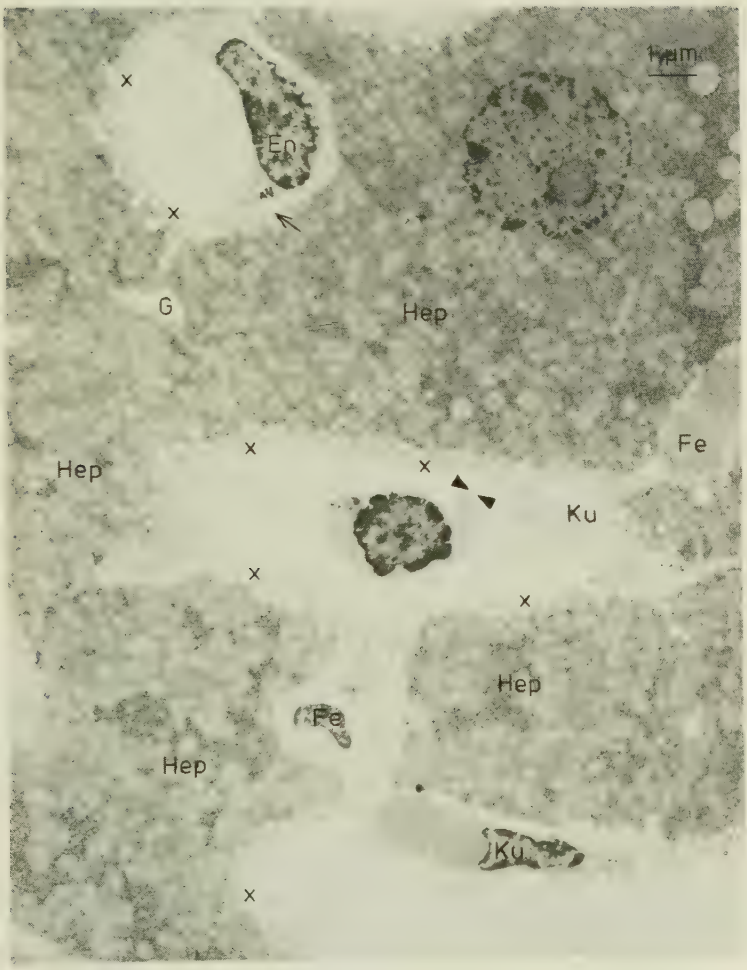


Abb. 1

Abb. 2. Kontakte der Lymphozyten (Ly) zu Kupfferzellen (Ku) sind variabel von Punkt- (►) bis zu Flächenkontakten (▻) (vgl. auch Abb. 1). Die Ausdehnung der Kontaktfläche nimmt im Beobachtungszeitraum zu. a) = 1 Std., b) 3 Std. nach Injektion der Lymphozyten. En = Endothelzelle, Hep = Hepatozyt, ✱ = Latex-Partikel

(Vergr. 13 000 : 1)

Abb. 2

Abb. 3. Zu Endothelzellen (En) bilden die Lymphozyten (Ly) ausschließlich Punktkontakte aus (►). Anzahl und Breite der Kontakte bleiben im Beobachtungszeitraum unverändert. a) 1 Std., b) 3 Std. nach Injektion der Lymphozyten. Ku = Kupfferzelle, Hep = Hepatozyt.

(Vergr. 13 000 : 1)

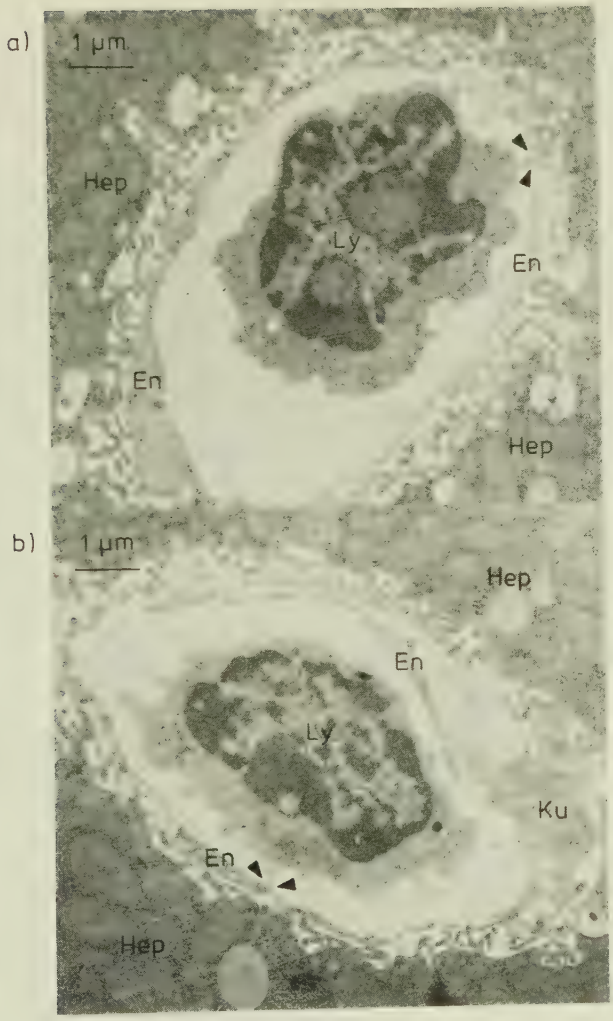


Abb. 3

Abb. 4. Feinstruktur der Kontakte zwischen Lymphozyten (Ly) und Kupfferzellen (Ku) bzw. Endothelzellen (En) im Tanninsäure/OsO_4-Kontrast. (Vergr. 66 000 : 1)

a), b) Flächige Kontakte zu Kupfferzellen mit weitgehend parallelen Membranen im Abstand von 30 - 60 nm; parallele "Brücken" im Bindungsbereich. La = Latex-Partikel.

c), d) Punktkontakte zu Endothelzellen, Membranabstand ca. 5 nm; von der Spitze des Lymphozyten-Mikrovillus strahlen divergente "Brücken"aus (►); Abhebung der äußeren Membranlage als Folge des Zugs der Lymphozyten während der Perfusion (⇒). Hep = Hepatozyt, DR = Dissescher Raum. ⊳ = "coated pit"

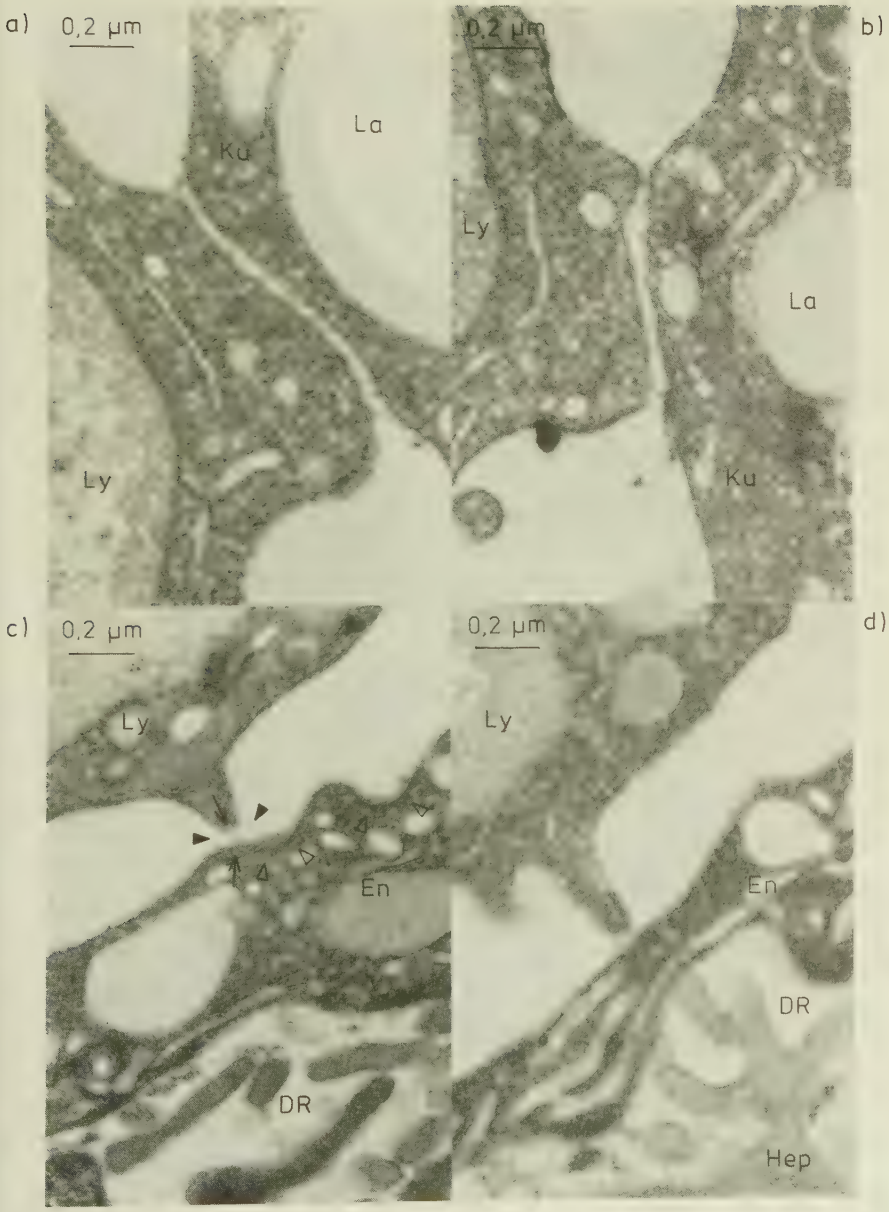


Abb. 4

Abb. 5. Kontakte der Lymphozyten (Ly) mit Hepatozyten (Hep) sind punktförmig (a), ►) oder flächig (b), ⊳) zu Hepatozyten-Mikrovilli, die durch Endothel-Fenestrae ragen. Die Mikrovilli der infiltrierenden Lymphozyten (⟶) sind von Hepatozyten-Mikrovilli bedeckt. x = endotheliale Auskleidung der Sinusoide, ✳ = Dissescher Raum. (Vergr. 13 000 : 1)

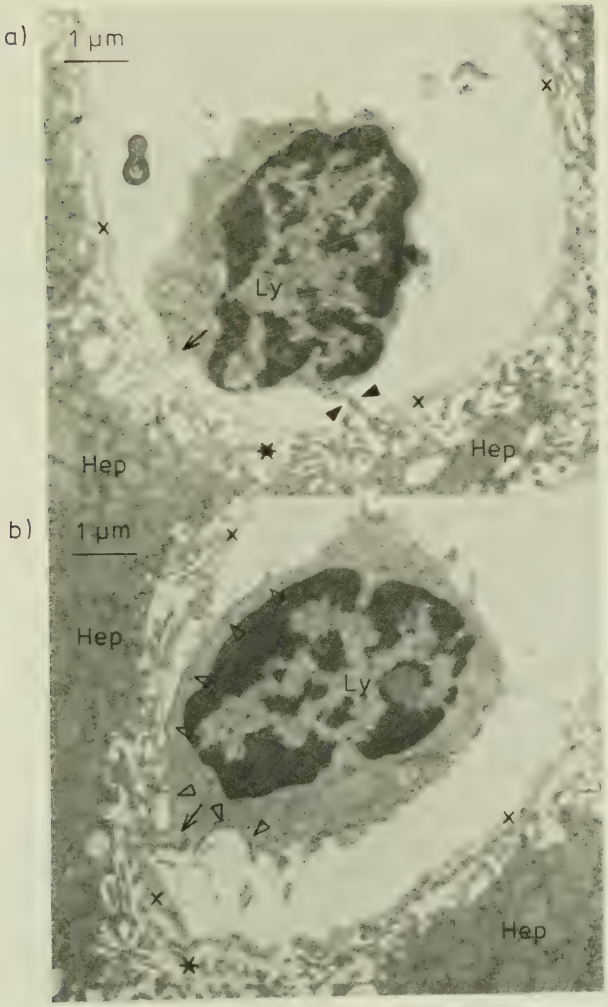


Abb. 5

Abb. 6. Infiltrierende Lymphozyten (Ly) bilden mit ihren Mikrovilli (►,▷) Invaginationsstrukturen an Endothelzellen (En) aus: a) flache Einbuchtung; b) maximale Ausdünnung der Endothelschicht; c) Lymphozyten-Mikrovillus Lumen- und Hepatozyten-seitig von Endothel bedeckt, was in geeigneten Anschnitten (d)) als Invaginationsstruktur zu erkennen ist (➡). In Invaginationen finden sich auch flächige Kontakte (▷) zwischen Lymphozyten und Endothelzellen (a), b), c)). Ku = Kupfferzelle, Hep = Hepatozyt, Fe = Fettzelle, ✱= Dissescher Raum. (Vergr. 13 000 : 1)

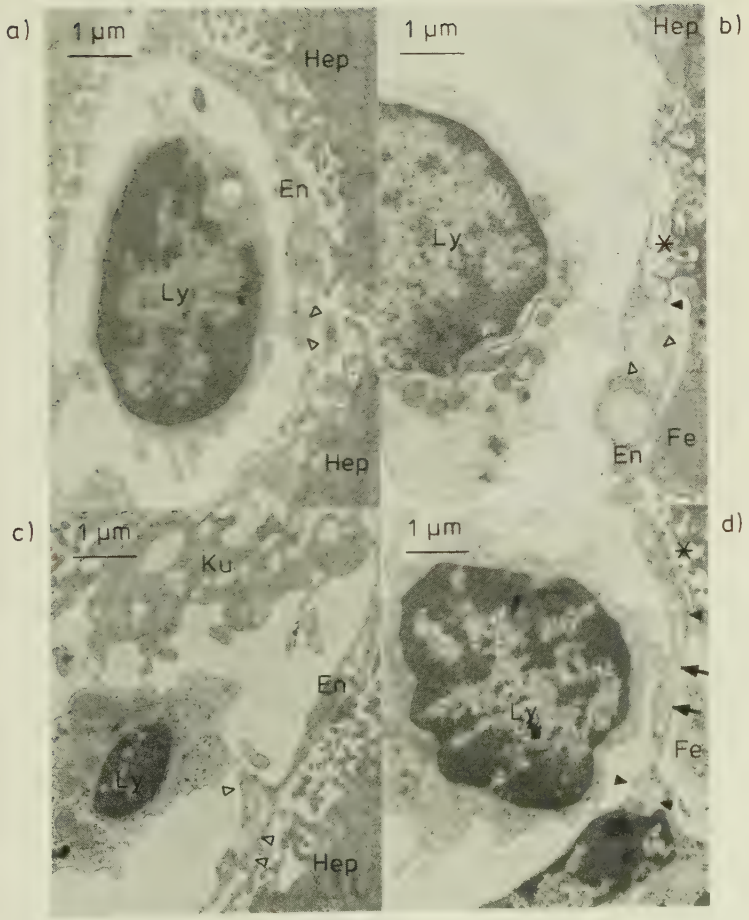


Abb. 6

Abb. 7. Infiltrierende Lymphozyten (Ly), deren Mikrovilli (⟶) durch das Endothel ragen a) an Siebplatten, b) im Bereich dickerer Endothelschichten, c) im Bereich der dünnen, gefensterten Fortsätze. Diese Mikrovilli bilden Invaginationsstrukturen an Hepatozyten aus (➞). Infiltrierende Lymphozyten haben in überdurchschnittlicher Anzahl Kontakt zu Kupfferzellen (⊳). Die Infiltrationstiefe nimmt im Beobachtungszeitraum zu: a), c) 1 Std.; b), d) 3 Std. nach Injektion. Stumpfe Lymphozyten-Fortsätze (d)) werden nur nach 3 Std. beobachtet. (Vergr. 13 000 : 1)

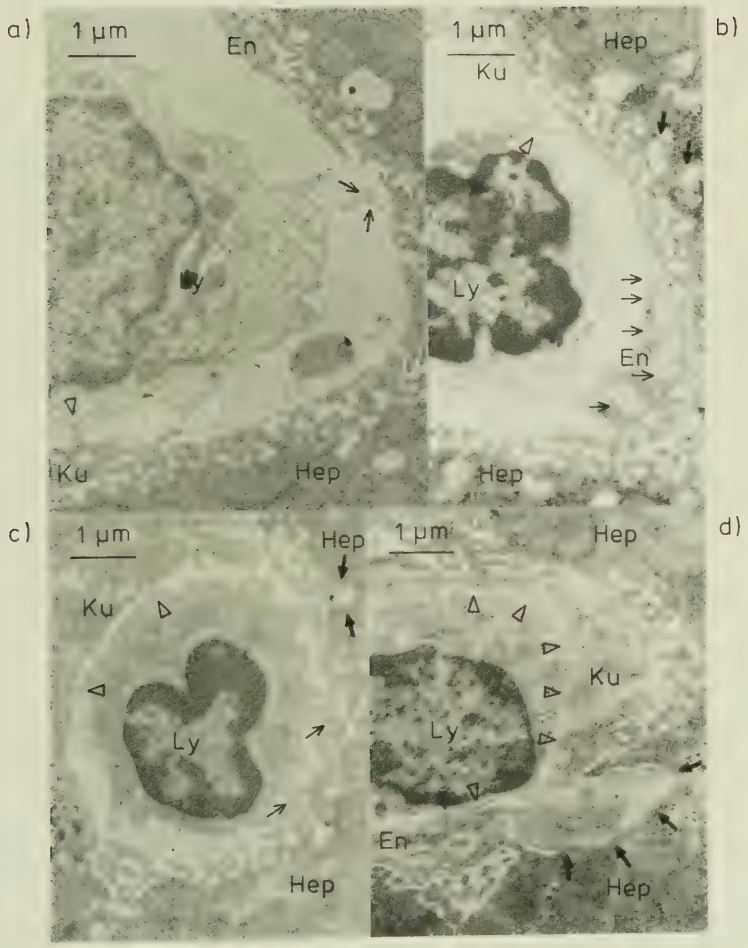

a)
1 µm
En
Ly
Ku
Hep
b)
1 µm
Ku
Hep
Ly
En
Hep
c)
1 µm
Hep
Ku
Ly
Hep
d)
1 µm
Hep
Ku
Ly
En
Hep

Abb. 7

Abb. 8. Feinstruktur der Invaginationen (Vergr. 50 000 : 1)

a), b) Standardkontrast, c), d) Tanninsäure/OsO_4-Kontrast.
a), c) Endothelzellinvaginationen, a) im Bereich eines "coated pit" (▷), c) flächige Kontakte (►), Membranabstand ca. 5 nm
b), d) Hepatozyteninvaginationen

Bei beiden Zielzellen im Kontaktbereich zwischen den Membranen elektronendichtes Material, das nicht in Brücken aufgelöst werden kann (c), d)).
Ly = Lymphozyt, Ku = Kupfferzelle, Hep = Hepatozyt, DR = Disse-scher Raum

a)
0,2 µm
Ly
En
En
DR
Hep
b)
0,2 µm
Ly
En
En
DR
Hep
c)
0,2 µm
Ly
En
Ku
En
DR
Hep
d)
0,2 µm
Ly
En
DR
Hep

Abb. 8

Abb. 9. Die Kontakte zwischen Lymphozyten und Kupfferzellen zeigen besondere Eigenschaften: Infiltrierende Lymphozyten (Ly) bilden an Kupfferzellen (Ku) keine Invaginationsstrukturen aus, im Gegensatz zu Endothelzellen (⟶). Lymphozyten werden im Gegensatz zu Erythrozyten (Ery) von Kupfferzellen nicht phagozytiert. En = Endothelzelle, Hep = Hepatozyt, ✱ = Latex-Partikel. (Vergr. 18 000 : 1)

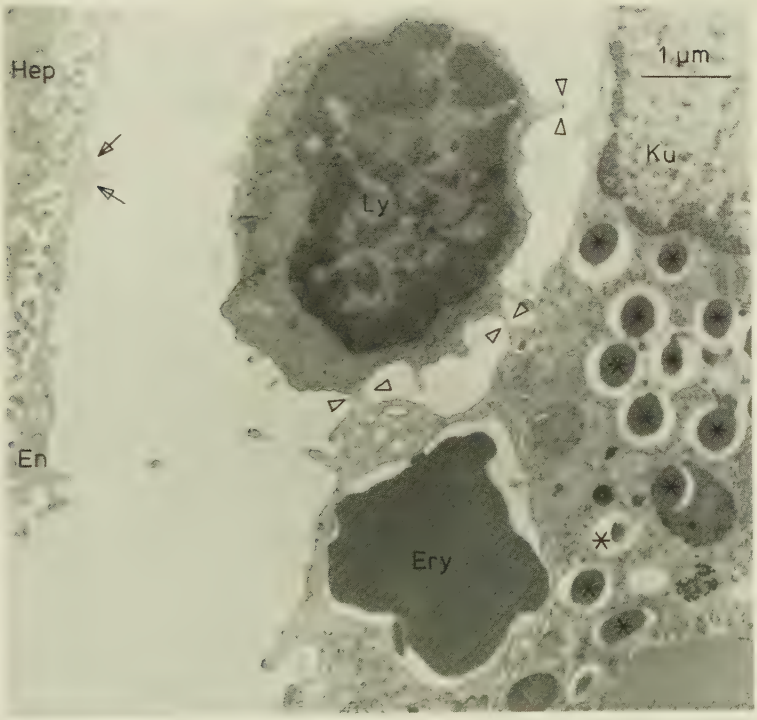


Abb. 9

8. LITERATUR

ABE, K. und ITO, T. (1970)

Fine structure of small lymphocytes in the thymus of the mouse: qualitative and quantitative analysis by electron microscopy

Z. Zellforsch. 110, 321-335

ASHWELL, G. und MORELL, A.G. (1974)

The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins

Adv. Enzymol. 41, 99-128

ASHWELL, G. und HARFORD, J. (1982)

Carbohydrate-specific receptors of the liver

Ann. Rev. Biochem. 51, 531-554

BANCHEREAU, J., DUBOS, M., AGNERAY, J. und DROUET, J. (1982)

A direct evidence for the early membrane desialylation in cobalt-irradiated mouse lymphocytes

Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, 512-516

BARONDES, S.H. (1981)

Lectins: their multiple endogenous cellular function

Ann. Rev. Biochem. 50, 207-231

CODINGTON, J.F., LINSLEY, K.B., JEANLOZ, R.W. et al. (1975)

Immunochemical and chemical investigations of the structure of glycoprotein fragments obtained from Epiglycanin, a glycoprotein at the surface of the TA3-Ha cancer cell

Carbohydr. Res. 40, 171-182

DRZENIEK, R. (1972)

Viral and bacterial neuraminidase

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 59, 35-74

FIELD, E.O., SHARPE, H.B.A., DAWSON, K.B., ANDERSEN, V., KILLMANN, S.A. und WEEKE, E. (1972)

Turnover rate of normal blood lymphocytes and exchangeable pool size in man, calculated from analysis of chromosomal aberrations sustained during extracorporal irradiation of the blood

Blood 39, 39-56

GESNER, B.M. und GINSBURG, V. (1964)

Effect of glycosidases on the fate of transfused lymphocytes

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52, 750-755

GLAUERT, A.M. und SANDERSON, C.J. (1979)

The mechanism of K-cell (antibody-dependent) mediated cytotoxicity III. The ultrastructure of K-cell projections and their possible role in target cell killing

J. Cell Sci. 35, 355-366

GOLDSTEIN, J.L., ANDERSON, R.G.W. und BROWN, M.S. (1979)

Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis

Nature 279, 679-685

GOWANS, J.L. (1959)

The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat

J. Physiol. 146, 54 ff

GOWANS, J.L. and KNIGHT, E.J. (1964)

The route of recirculation of lymphocytes in the rat

Proc. Roy. Soc. Ser. B. Biol. Sci. 159, 257-282

HAEGERT, D.G. (1977)

Neuraminidase- and trypsin-induced exposure of membrane receptors for IgG and IgM molecules on human peripheral blood lymphocytes

Clin. Exp. Immunol. 29, 457-463

HOLL, N. (1981)

Die Rolle eines auf Makrophagen der Leber vorkommenden Galaktose-spezifischen Rezeptors bei der Erkennung und Bindung von Krebszellen

Erste Staatsprüfung für das Lehramt am Gymnasium
Schriftliche Hausarbeit in Biologie

HUBBARD, A.L., WILSON, G., ASHWELL, G. und STUKENBROK, H. (1979)

An electron microscope autoradiographic study of the carbohydrate recognition systems in rat liver
I. Distribution of ^{125}J-ligands among the liver cell types

J. Cell Biol. 83, 47-64

HUTCHINSON, D.W. und KABAYO, J.P. (1977)

Current thoughts on neuraminidase

Trends Biochem. Sci. 2, 1-3

JANCIK, J.M., SCHAUER, R., ANDRES, K.H. und VON DÖRING, M. (1978)

Sequestration of neuraminidase-treated erythrocytes
Studies on its topographic, morphologic and immunologic aspects

Cell Tiss. Res. 186, 209-226

KALINA, M. und HOLLANDER, N. (1975)

The effect of cytochalasin B on effector-target cell interaction Quantitative and ultrastructural study

Immunology 29, 709-717

KOLB, H., KRIESE, A., KOLB-BACHOFEN, V. und KOLB, H.A. (1978)

Possible mechanism of entrapment of neuraminidase-treated lymphocytes in the liver

Cell. Immunol. 40, 457-462

KOLB, H., KOLB-BACHOFEN, V. und SCHLEPPER-SCHÄFER, J. (1979)

Cell contacts mediated by D-galactose-specific lectins on liver cells

Biol. Cell. 36, 301-308

KOLB, H., VOGT, D., HERBERTZ, L., CORFIELD, A., SCHAUER, R. und SCHLEPPER-SCHÄFER, J. (1980)

The galactose-specific lectins on rat hepatocytes and Kupffer cells have identical binding characteristics

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1747-1750

KOLB, H., FRIEDRICH, E., und SOSS, R. (1981)

Lectin mediates homing of sialidase-treated erythrocytes of the liver as revealed by scintigraphy

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1609-1614

KOLB-BACHOFEN, V. (1981)

Hepatic receptor for asialo-glycoproteins
Ultrastructural demonstration of ligand-induced microaggragation of receptors

Biochim. Biophys. Acta 645, 293-299

KOLB-BACHOFEN, V. und KOLB, H. (1979)

Autoimmune reactions against liver cells by syngeneic neuraminidase-treated lymphocytes

J. Immunol. 123, 2830-2834

KOLB-BACHOFEN, V., SCHLEPPER-SCHÄFER, J., VOGELL, W. und KOLB, H. (1982)

Electron microscopic evidence for an asialoglycoprotein receptor on Kupffer cells: localization of lectin-mediated endocytosis

Cell 29, 859-866

KOLB-BACHOFEN, V., VOGT, D., SCHLEPPER-SCHÄFER, J. und KOLB, H. (1983)

Demonstration of asialoglycoprotein receptors on three different liver cell types: difference in function. In: "Glycoconjugates", Proceedings of the 7th International Symposium on Glycoconjugates. Lund-Ronneby, July 17-23, 1983. Hrsg.: Chester,M.A., Heinegård, D., Lundblad, A., Svensson, S.

Rahms, Lund, pp. 650-651

KORNFELD, R. und KORNFELD, S. (1980)

Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units.
In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans

Hrsg.: Lennarz, W.J.; Plenum Press, New York, pp. 1-34

DE LEEUW, A.M., SLEYSTER, E.Ch., QUIST, M.J. und KNOOK, D.L. (1982)

Rat and mouse Kupffer and endothelial cells: a comparison of structural and functional characteristics

Kupffer Cell Bull. 4, Heft 1, pp. 4-8

LONDON, J., BERRIH, S. und BACH, J.-F. (1978)

Peanut agglutinin
I. A new tool for studying T lymphocyte subpopulations

J. Immunol. 121, 438-443

LÖBEN, G., SEDLACEK, H.H. und SEILER, F.R. (1976)

Quantitative experiments on the cell membrane binding of neuraminidase

Behring Inst. Mitt. 59, 30-37

MARCHESI, V.T. (1979)

Spectrin: present status of a putative cyto-skeletal protein of the red cell membrane

J. Membrane Biol. 51, 101-131

MATTER, A. (1975)

Morphological definition of thymocyte subpopulations

Cell Tiss. Res. 158, 319-332

MÜLLER, E., FRANCO, M.W. und SCHAUER, R. (1981)

Involvement of membrane galactose in the in vivo and in vitro sequestration of desialylated erythrocytes

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1615-1620

MUNN, M.W. und PARCE, J.W. (1982)

Antibody-dependent phagocytosis of haptenated liposomes by human neutrophils is dependent on the physical state of the liposomal membrane

Biochim. Biophys. Acta 692, 101-108

MUNTHE-KAAS, A.C. (1976)

Phagocytosis in rat Kupffer cells in vitro

Exp. Cell Res. 99, 319-327

NOVOGRODSKY, A. und ASHWELL, G. (1977)

Lymphocyte mitogenesis induced by a mammalian liver protein that specifically binds desialylated glycoproteins

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 676-678

PEARSE, B.M.F. und BRETSCHER, M.S. (1981)

Membrane recycling by coated vesicles

Ann. Rev. Biochem. 50, 85-101

PEREIRA, M.E., KABAT, E.A., LOTAN, R. und SHARON, N. (1976)

Immunochemical studies on the specificity of the peanut (Arachis hypogaea) agglutinin

Carbohyd. Res. 51, 107-118

PERLMANN, P. und HOLM, G. (1969)

Cytotoxic effects of lymphoid cells in vitro

Adv. Immunol. 11, 117-193

RAEDLER, A., RAEDLER, E., ARNDT, R. und THIELE, H.-G. (1981)

Terminal galactosyl residues of cell-surface glycoconjugates exposed on both human and murine immature T- and B-cells

Cell Tiss. Res. 218, 219-226

REISNER, Y., LINKER-ISRAELI, M. und SHARON, N. (1976)

Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin

Cell. Immunol. 25, 129-134

ROSENBERG, S.A. und SCHWARZ, S. (1974)

Murine autoantibodies to a cryptic membrane antigen: possible explanation for neuraminidase-induced increase in cell immunogenicity

J. Natl. Cancer Inst. 52, 1151-1155

RYSER, J.-E., SORDAT, B., CEROTTINI, J.-C. und BRUNNER, K.T. (1977)

Mechanism of target cell lysis by cytolytic T lymphocytes
I. Characterization of specific lymphocyte-target cell conjugates separated by velocity sedimentation

Eur. J. Immunol. 7, 110-117

SANDERSON, C.J. und GLAUERT, A.M. (1979)

The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity
VI. T-cell projections and their role in target cell killing

Immunology 36, 119-129

SCHREIBER, A.D. und FRANK, M.M. (1972)

Role of antibody and complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes
II. Molecular nature of IgG and IgM complement fixing sites and effects of their interaction with serum

J. Clin. Invest. 51, 583-589

SEARLE, R.F. und FLAKS, B. (1976)

A technique for liver transplantation in the inbred mouse

Transplantation 22, 256-264

SILVERSTEIN, S.C., STEINMAN, R.M. und COHN, Z.A. (1977)

Endocytosis

Ann. Rev. Biochem. 46, 669-722

SPRINGER, G.F., DESAI, P.R. and BANATWALA, I. (1975)

Blood group MN antigens and precursors in normal and malignant human breast glandular tissue

J. Natl. Cancer Inst. 54, 335-339

SPRINGER, G.F., DESAI, P.R., MURTHY, M.S., TEGTMEYER, H. und SCANLON, E.F. (1979)

Human carcinomata-associated precursor antigens of the blood group MN system and the host's immune responses to them

Prog. Allergy 26, 42-96

SPURR, A. (1969)

A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy

J. Ultrastruct. Res. 26, 31-43

STEER, C.J., RICHMAN, L.K., HAGUE, N.E. et al. (1978)

Identification of receptors for immunoglobulin and complement on mouse Kupffer cells in vitro (abstr.)

Gastroenterology 75, 988

STEER, C.J. und CLARENBURG, R. (1979)

Unique distribution of glycoprotein receptors on parenchymal and sinusoidal cells of rat liver

J. Biol. Chem. 254, 4457-4461

STEER, C.J., JAMES, S.P., VIERLING, J.M., HOSEA, S.W. und JONES, E.A. (1980)

The selective hepatic uptake of desialylated peripheral blood mononuclear cells in rabbits

Gastroenterology 79, 917-923

STÖHR, G., DEIMANN, W. und FAHIMI, H.D. (1978)

Peroxidase-positive endothelial cells in sinusoids of the mouse liver

J. Histochem. Cytochem. 26, 409-411

TÖRÖ, J., RUSZA, P. und RÖHLICH, P. (1962)

Ultrastructure of early phagocytic stages in sinus endothelial and Kupffer cells of the liver
Exp. Cell Res. 26, 601-603

VAITH, P. und UHLENBRUCK, G. (1979)

The Thomsen agglutination phenomenon: a discovery revisited 50 years later

Z. Immun. Forsch. 154, 1-14

VEERMAN, A.J.P. und VAN EWIJK, W. (1975)

White pulp compartments in the spleen of rats and mice
A light and electron microsopic study of lymphoid and non-lymphoid celltypes in T- and B-areas

Cell Tiss. Res. 156, 417-441

VIERLING, J.M., STEER, C.J., HICKMAN, J.W., JAMES, S.P. und JONES, E.A. (1978)

Cell-mediated cytotoxicity of desialylated human lymphocytes induced by a mitogenic mammalian liver protein

Gastroenterology 75, 456-461

WATKINS, W.M. (1979)

Biochemistry of blood cell membrane antigens

Rev. Fr. Transfus. Immunohematol. 22, 35-57

WIDMANN, J.-J., COTRAN, R.S. und FAHIMI, H.D. (1972)

Mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells
Identification of two functional cell types in rat liver sinusoids by endogenous peroxidase activity

J. Cell Biol. 52, 159-170

WINCHESTER, R.J., FU, S.M., WINFIELD, J.B. et al. (1975)

Immunofluorescent studies on antibodies directed to a buried membrane structure present in lymphocytes and erythrocytes

J. Immunol. 114, 410-414

WISSE, E. (1972)

An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells

J. Ultrastruct. Res. 38, 528-562

WISSE, E. (1974)

Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells

J. Ultrastruct. Res. 46, 393-426

WISSE, E. (1977)

Ultrastructure and function of Kupffer cells and other sinusoidal cells in the liver
In: Kupffer cells and other liver sinusoidal cells
Hrsg.: Wisse, E. und Knook, D.L.
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 33-60

WISSE, E., VAN'T NOORDENDE, J.M., VAN DER MEULEN, J. und DAEMS, W.T. (1976)
The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood
Cell Tiss. Res. 173, 423-435

WOODRUFF, J.J. und GESNER, B.M. (1968)

Lymphocytes: circulation altered by trypsin

Science 161, 176-178

WOODRUFF, J.J. und GESNER, B.M. (1969)

The effect of neuraminidase on the fate of transfused lymphocytes

J. Exp. Med. 129, 551-567

WOODRUFF, J.J. and WOODRUFF, J.F. (1974)

Virus-induced alterations of lymphoid tissues
IV. The effect of Newcastle disease virus on the fate of transfused thoracic duct lymphocytes

Cell. Immunol. 10, 78-85

WOODRUFF, J.J. und WOODRUFF, J.F. (1976)

Influenza A virus interaction with murine lymphocytes
I. The influence of influenza virus A/Japan 305 (H2N2) on the pattern of migration of recirculating lymphocytes

J. Immunol. 117, 852-858

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. phil. W. Vogell, möchte ich für die Überlassung des Themas und seine großzügige Unterstützung danken.

Mein Dank gilt Frau Dr. rer. nat. V. Kolb-Bachofen als Betreuerin dieser Arbeit, für ihr Engagement bei Durchführung und Diskussion der Versuche sowie für ihre Anregungen bei der Abfassung des Textes.

Frau Dr. rer. nat. J. Schlepper-Schäfer und Frau G. Dzulko danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Frau I. Werner danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Abwicklung der Schreibarbeiten.

Ich danke Frau S. Wenzel-Unger und Frau M. Turken für die Anfertigung der Positiv-Abzüge des elektronenmikroskopischen Bildmaterials sowie den Mitarbeitern des Instituts für Biophysik und Elektronenmikroskopie für die Einarbeitung in die Methoden und die freundliche Zusammenarbeit.

L E B E N S L A U F

Name:	Bernhard Birmes
Geboren:	3.4.1957
Familienstand:	Ledig
Eltern:	Alex Birmes, Diplom-Ingenieur für Bauwesen Brigitta Birmes, geb. Fleischer, Krankenschwester, jetzt Hausfrau
Grundschule:	1963 bis 1967: Görresschule, Neuss
Höhere Schule:	1967 bis 1975: Theodor Schwann-Gymnasium, Neuss; Abitur am 13.6.1975
Studium:	WS 1975 bis SS 1981: Medizin, Universität Düsseldorf
Praktisches Jahr:	20.10.1980 bis 18.9.1981: Lukaskrankenhaus, Neuss; Wahlfach Anästhesie
Prüfungen:	Ärztliche Vorprüfung: 31.8.1977 Ärztliche Prüfung: 1. Teil: 31.08.1978 2. Teil: 22.08.1980 3. Teil: 29.10.1981
Approbation:	10.12.1981
Berufliche Tätigekeit:	Seit 1.6.1982 Assistenzarzt an der Anästhesie-Abteilung des St. Marien-Hospitals Lünen, Chefarzt Dr. med. A. Vollmar